

Tesis de Posgrado

Mecanismo de acción molecular de los corticoides en la médula espinal

Orti, Eduardo

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Orti, Eduardo. (1985). Mecanismo de acción molecular de los corticoides en la médula espinal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1932_Orti.pdf

Cita tipo Chicago:

Orti, Eduardo. "Mecanismo de acción molecular de los corticoides en la médula espinal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1932_Orti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMO DE ACCION MOLECULAR
DE LOS CORTICOIDES EN LA MEDULA ESPINAL

Autor: EDUARDO ORTI

Director: Dr. ALEJANDRO F. DE NICOLA

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL
Obligado 2490, Buenos Aires

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Ciencias Químicas

1985

Tesis 1932
y.2

A Silvia,
a mis padres.

Agradezco especialmente a:

- Dr. Alejandro De Nicola, mi Director de Tesis, por su dedicación, estímulo y guía permanentes;
- mis compañeros de laboratorio: Lic. Silvia Tornello, Dres. Héctor Coirini, Claudia Heller, Liliana Weisenberg y Osvaldo Fridman, Bqca. Ana María Magariños y Lic. Daniel Moses, por su cálido apoyo y colaboración;
- Sra. Elsa di Matteo y Srta. Sandra Luchetta, por la eficiente ayuda técnica;
- mis docentes de Química Biológica: Dres. Eduardo Charreau, Carlos Lantos, Juan Carlos Calvo, Marta Tessone, Omar Pedro Pignataro y Lic. Lucrecia Piñeiro, por sus valiosas enseñanzas;
- Lic. Juan Pablo Radicella, por su amistad, sus enriquecedoras discusiones y su contribución en los programas de computación;
- los Sres. Saúl Corbalán, Daniel Nieva y Juan José Cieslak, del bioterio del IBYME, por su cordial y esmerada atención;
- Lic. Marcelo de las Heras, por sus consejos para la determinación de la ornitina descarboxilasa;
- Sr. Alejandro Esteras, de Papelsa, por su voluntariosa colaboración en la impresión de la tesis;
- Dr. Virgilio G. Foglia, Director del IBYME, y a todo el personal científico, técnico, de mantenimiento, de biblioteca y administrativo del mismo, por su invalorable asistencia;
- A mi padre, mi madre y a toda mi familia porque me apoyaron y estimularon siempre;
- A Silvia, mi esposa, por haber sido mucho más que eso.

E.O.

INDICE

I.	<u>INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS</u>	1
	MECANISMOS MOLECULARES DE ACCION	
	DE LOS CORTICOIDES.....	2
	- Estructura química.....	2
	- Efectos fisiológicos: Acción de los GC en distintos tejidos, Efectos fisiológicos de los GC en el estrés, Efectos de los MC.....	4
	- Mecanismos de acción: Biosíntesis, Transporte, Estructura de los receptores intracelulares, Factores estabilizantes de los receptores, Transformación del complejo hormona-receptor, Modelo del ciclado intracelular de receptores, Regulación de la expresión genómica, Mecanismos de acción no genómicos.....	7
	ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA MEDULA ESPINAL.....	23
	- Células del SN: Neurona, Neuroglía.....	23
	- Bioquímica del SN: Metabolismo energético, Transporte axónico, Neurotransmisión.....	26
	- Anatomía de la ME: Anatomía macroscópica, Estructura interna.....	30
	- Función de la ME: Reflejos medulares, Funciones de la ME luego de extraer el cerebro.....	33
	CORTICOIDES Y SISTEMA NERVIOSO.....	38
	- Acción de los corticoides sobre el tejido nervioso: Efectos específicos sobre la química y función del cerebro, Efectos sobre actividades enzimáticas, Efectos sobre la electrofisiología.....	38
	- Receptores de corticoides en el SN: Poblaciones de receptores, Incorporación de corticoides "in vivo", Ontogenia de los receptores.....	42
	- Corticoides y ME.....	49
	OBJETIVOS.....	51
II.	<u>PROPIEDADES, DISTRIBUCION Y ONTOGENIA DE LOS SITIOS</u>	
	<u>DE UNION CITOSOLICOS PARA GLUCOCORTICOIDES DE LA</u>	
	<u>MEDULA ESPINAL</u>	54
	INTRODUCCION.....	55

MATERIALES Y METODOS.....	57
- Animales de experimentación.....	57
- Disección del SN.....	57
- Determinación de los sitios de unión para GC.....	58
- Estudios cinéticos.....	60
- Efecto de protectores y bloqueantes de grupos sulfhidrilo.....	60
- Estudios de saturación.....	60
- Estudios de competencia.....	61
- Sedimentación en gradientes de glicerol.....	62
- Distribución zonal.....	63
- Ontogenia.....	63
RESULTADOS.....	65
- Estudios cinéticos.....	65
- Efecto de protectores y bloqueantes de grupos sulfhidrilo.....	68
- Estudios de saturación.....	68
- Estudios de competencia.....	71
- Sedimentación en gradientes de glicerol.....	74
- Distribución zonal.....	74
- Ontogenia.....	78
DISCUSION.....	82

III. ESTUDIO DE LA TRANSFORMACION DE LOS SITIOS DE UNION

<u>PARA GLUCOCORTICOIDES DE LA MEDULA ESPINAL.....</u>	87
INTRODUCCION.....	88
MATERIALES Y METODOS.....	91
- Animales de experimentación y disección del SN...	91
- Marcación de los sitios de unión citosólicos con (3H)-DEX.....	91
- Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	92
- Determinación de fosfato inorgánico.....	93
- Ensayo de unión a ADN-celulosa.....	94
- Obtención de una fracción nuclear purificada.....	94
- Unión de complejos citosólicos a la fracción nuclear.....	95
- Método rápido de cromatografías combinadas en minicolumnas.....	96
- Análisis estadístico.....	98
RESULTADOS.....	99
- Unión de complejos citosólicos a la fracción nuclear.....	99

- Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	99
- Unión a ADN-celulosa.....	101
- Análisis cromatográfico en minicolumnas combinadas.....	106
DISCUSION.....	110
 IV. <u>ESTUDIOS "IN VIVO" DE LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES EN LA MEDULA ESPINAL: CAPTACION NUCLEAR DE CORTICOSTERONA.....</u>	113
INTRODUCCION.....	114
MATERIALES Y METODOS.....	117
- Animales de experimentación y disección del SN.....	117
- Obtención de fracciones subcelulares.....	117
- Captación nuclear de (³ H)-CORT en ME e HC.....	117
- Determinación de CORT en tejidos y fracciones nucleares por RIA.....	118
- Determinación de CORT sérica por radiocompetición proteica.....	123
RESULTADOS.....	124
- Distribución de la CORT endógena.....	124
- Incorporación nuclear de CORT.....	127
DISCUSION.....	133
 V. <u>ESTUDIO DE LA UNION DE (³H)-ALDOSTERONA EN LA MEDULA ESPINAL: PRESENCIA DE SITIOS DE ALTA AFINIDAD Y SELECTIVIDAD.....</u>	142
INTRODUCCION.....	143
MATERIALES Y METODOS.....	148
- Animales de experimentación.....	148
- Determinación de sitios de unión citosólicos....	148
- Transformación de los sitios de alta afinidad por (³ H)-ALDO.....	149
- Análisis estadístico.....	149
RESULTADOS.....	151
- Estudios cinéticos y de saturación.....	151

- Estudios de competencia.....	154
- Distribución regional.....	160
-Transformación de los sitios de tipo I.....	160
DISCUSION.....	164
 VI. <u>EFFECTOS BIOLOGICOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA</u>	
<u>MEDULA ESPINAL: REGULACION DE GLICEROL-FOSFATO</u>	
<u>DESHIDROGENASA Y ORNITINA DESCARBOXILASA.....</u>	169
INTRODUCCION.....	170
MATERIALES Y METODOS.....	173
- Animales de experimentación y tratamiento con esteroides.....	173
- Determinación de la actividad de GPDH.....	173
- Determinación de la actividad de ODC.....	176
- Determinación de la unión citosólica de (3H)-DEX.....	177
- Análisis estadístico.....	178
RESULTADOS.....	179
- Efectos crónicos sobre la actividad de GPDH.....	179
- Efectos crónicos sobre la actividad de ODC.....	182
- Cinética del efecto de una única dosis de GC sobre GPDH, ODC y la unión citosólica de (3H)-DEX.....	184
- Respuesta a diferentes dosis de GC.....	187
- Especificidad del efecto sobre ODC.....	189
- Distribución de los niveles basales y estimulados de GPDH y ODC.....	189
DISCUSION.....	193
 VII. <u>CONSIDERACIONES FINALES.....</u>	201
RESUMEN Y DISCUSION GENERAL.....	202
PERSPECTIVAS.....	212
 REFERENCIAS.....	215

ABREVIATURAS

ACTH	adrenocorticotrofina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADX	adrenalectomía / adrenalectomizado(s)
ALDO	aldosterona
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina-5'-trifosfato
C	cervical
CORT	corticosterona
CRF	factor liberador de adrenocorticotrofina
DEAE	dietilaminoetano
DEX	dexametasona
DOC	11-desoxicorticosterona
DTT	ditiotreitol
EDTA	sal disódica del ácido etiléndiaminotetraacético
GABA	ácido γ -aminobutírico
GC	glucocorticoide(s)
GPDH	glicerolfosfato deshidrogenasa
HAP	hidroxilapatita
HC	hipocampo
ID ₅₀	concentración inhibitoria al 50 %
i.p.	intra peritoneal
Kd	constante de disociación

L	lumbar
MC	mineralocorticoide(s)
ME	médula espinal
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido reducido
ODC	ornitina descarboxilasa
ORN	ornitina
RBA	afinidad relativa de unión
RIA	radioinmunoanálisis
RU 26752	3-(3'-oxo-7' α -propil-17' β -hidroxi-androstan-4'-en-17' α il)-propionolactona
RU 26988	11 β ,17 β -dihidroxi-17 α -(1'-propionil)-androstan-1,4,6-trien-3-ona
RU 28362	11 β ,17 β -dihidroxi-6-metil-17 α -(1'-propionil)-androstan-1,4,6-trien-3-ona
s.c.	sub-cutáneo
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
T	torácico
TA	acetónido de triamcinolona

I. INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS

MECANISMOS MOLECULARES DE ACCION DE LOS CORTICOIDES

ESTRUCTURA QUIMICA

Desde el punto de vista químico, se consideraba como tipos de moléculas glucocorticoides (GC) a las del grupo del cortisol y la corticosterona (CORT) y de molécula mineralocorticoide (MC) a la 11-desoxicorticosterona (DOC, figura I-1). La comparación de las cuatro fórmulas superiores de la figura muestra una correlación entre estructura plana y acción biológica, que guarda cierta vigencia. Las características comunes de estos esteroides son su grupo cetona en C3, un doble enlace entre C4 y C5, una función cetona en C20 y un hidroxilo en C21. El C11 oxidado a alcohol o carbonilo parecería marcar la diferencia entre GC y MC. Al observar la fórmula de la aldosterona (ALDO), un MC casi 100 veces más potente que DOC, se observa que también posee un hidroxilo en C11, sin embargo su forma aldehídica o "abierta" se halla en equilibrio con tautómeros cíclicos en los cuales el aldehído angular en C18 interacciona con los hidroxilos estéricamente cercanos. En los fluidos biológicos el equilibrio se halla desplazado hacia alguno de estos tautómeros, verificándose entonces la ausencia de hidroxilo o carbonilo en el C11 de la molécula MC [1].

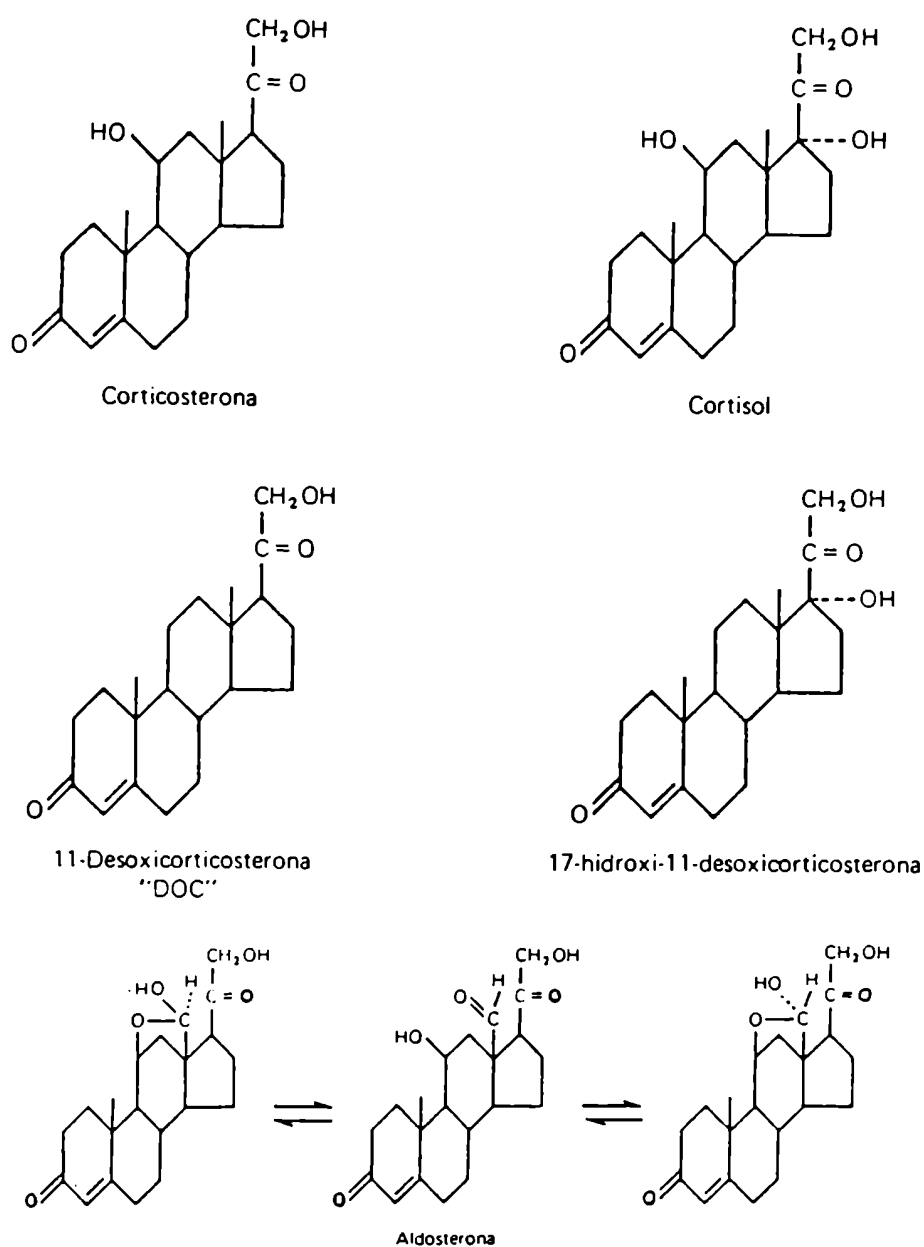


Figura I-1 : Estructuras planas de corticoides.

En la parte superior se muestran las estructuras de GC : corticosterona y cortisol, por debajo la de MC : 11-desoxicorticosterona, 17-hidroxi-11-desoxi-corticosterona (MC subóptimo) y aldosterona con sus formas abiertas y cíclicas (hemiacétalicas)[1].

EFFECTOS FISIOLOGICOS

Acción de los GC en distintos tejidos

Los GC son hormonas sistémicas que regulan el metabolismo de la mayoría de las células del organismo. Sus acciones pueden clasificarse en anabólicas y catabólicas, existiendo otras funciones del sistema nervioso (SN) que no se encuadran en estos conceptos.

La acción anabólica (de síntesis) es ejercida principalmente en el hígado, riñón y pulmón. En el hígado y riñón favorecen la gluconeogénesis a partir de aminoácidos circulantes induciendo las transaminasas que los convierten en α -cetoácidos, precursores de la glucosa. Las enzimas claves de la gluconeogénesis (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y glucosa-6-fosfatasa) también son inducidas, favoreciendo el depósito de glucógeno y el aumento de la glucemia. La hiperglucemia producida es facilitada además por la inhibición de la captación de glucosa en aquellos tejidos donde actúan como agentes catabólicos. En el riñón, además de ser gluconeogénéticos, los GC activan la filtración glomerular. En el pulmón aceleran la maduración en el feto y aumentan la síntesis de fosfolípidos.

La acción catabólica (de degradación) se realiza en el tejido adiposo, linfóide, conectivo, muscular, cutáneo y óseo. Los GC degradan las proteínas y lípidos liberando a la sangre aminoácidos, glicerol y ácidos grasos.

En la tabla I-1 se enumeran las acciones estimulantes o

Tabla I-1: Efectos estimulantes e inhibitorios de los GC.

Efectos estimulantes

1. Depósito de glucógeno en el hígado
2. Gluconeogénesis a partir de aminoácidos en el hígado
3. Captación hepática de aminoácidos circulantes
4. Transaminasas hepáticas
5. Biosíntesis de proteínas en el hígado
6. Lipólisis en el tejido adiposo
7. Formación de cuerpos cetónicos
8. Filtración glomerular renal
9. Eritropoyesis y leucopoyesis
10. Secreción estomacal (ácido clorhídrico y pepsina)
11. Elevación de la presión arterial
12. Resistencia al estrés
13. Propiedades cardiotónicas
14. Crecimiento y maduración del pulmón fetal

Efectos inhibitorios

1. Captación de glucosa por las células periféricas (resultado: hiperglucemia)
 2. Metabolismo proteico en músculo, hueso, tejido linfoideo
 3. Lipogénesis en el tejido adiposo
 4. Reabsorción tubular renal de agua
 5. Número de eosinófilos, basófilos y linfocitos de la sangre
 6. Crecimiento del tejido linfático normal (timo, ganglios, bazo) y patológico (linfomas)
 7. Síntesis de matriz ósea (resultado: osteoporosis)
 8. Respuesta inmunitaria (resultado: disminución de anticuerpos)
 9. Respuesta anti-inflamatoria y anti-alérgica
 10. Secreción de CRF y ACTH
 11. Supresión de mediadores: citoquinas, prostanoides, quininas, serotonina
-

[Modificado de A. F. De Nicola, en "Endocrinología Molecular" (R. S. Calandra y A. F. De Nicola editores). El Ateneo, Buenos Aires, pp. 199-219 (1985)].

inhibitorias de los GC. La inhibición de la respuesta inmunitaria, anti-inflamatoria y anti-alérgica es la que ha generado una amplia aplicación de los GC en la farmacología clínica y terapéutica.

Las acciones nerviosas de los GC incluyen la regulación del comportamiento y la conducta, cambios enzimáticos, la modulación de los fenómenos eléctricos y la retroalimentación negativa sobre la secreción hipofisaria de ACTH [2]. Estas acciones serán detalladas más adelante.

Efectos fisiológicos de los GC en el estrés

Los niveles de GC aumentan marcadamente en respuesta al estrés producido por alteraciones en la homeostasis. A estos niveles elevados se les ha asignado tradicionalmente la función de aumentar la resistencia del organismo al estrés. Contrariamente a la idea de que la función de los GC es facilitar los mecanismos de defensa, cada vez resulta más evidente que a niveles moderados o elevados los GC producen su supresión. Esta paradoja surgió cuando se descubrió que los GC eran agentes anti-inflamatorios y ha permanecido como obstáculo en la tarea de unificar las funciones de los GC.

Munck y col. [3] han propuesto que las altas concentraciones de GC inducidas en el estrés no protegen contra las causas del mismo sino contra las reacciones normales del organismo al estrés, impidiendo que ellas mismas se disparen y amenacen la homeostasis. Esta hipótesis explica la paradoja planteada y provee a la fisiología de los GC de un concepto unificado de sus

funciones que puede relacionar efectos fisiológicos y farmacológicos tan diversos como el metabolismo de los hidratos de carbono, los procesos inflamatorios, el "shock" y el balance hídrico. Este modelo también propone que las enzimas inducidas por los GC son agentes detoxificantes de mediadores producidos durante el estrés como mecanismo de defensa, pudiendo causar daño si no son sometidos a una regulación posterior.

Efectos de los MC

La acción biológica de los MC, es la regulación del metabolismo mineral en el organismo. Primordialmente retienen sodio y cuantitativamente los demás efectos de estas hormonas como el control de la retención de agua y el de la eliminación de potasio son menos importantes [1].

Los MC tienen también efecto sobre el comportamiento, siendo el ejemplo clásico la regulación de la ingesta de sal. Bajas dosis de MC disminuyen el apetito salino de ratas adreno-privas, mientras que concentraciones mayores producen el efecto inverso. Otros efectos descritos incluyen cambios en los electrolitos cerebrales, en edema cerebral, la actividad eléctrica de las neuronas y mecanismos de retroalimentación sobre la secreción de ACTH [4].

MECANISMOS DE ACCION

Biosíntesis

Los corticoides se sintetizan en las glándulas adrenales. En el humano la zona glomerulosa produce ALDO, mientras que la

fasciculada-reticular produce cortisol; en la rata la ALDO también se sintetiza en la glomerulosa, mientras que la fasciculada-reticular produce su principal GC: la CORT.

El compuesto madre de los corticoides es el colesterol, que puede sintetizarse de novo a partir de acetato o provenir de la captación del colesterol plasmático, posiblemente la fuente más importante. Las moléculas donantes de colesterol a la adrenal son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL), según las especies. El colesterol de las lipoproteínas se esterifica con ácidos grasos en las células adrenales, se deposita en el citoplasma en forma de gotitas lipídicas y puede hidrolizarse a colesterol libre por acción de la enzima colesterol esterasa.

La síntesis comienza en las mitocondrias con la ruptura de la cadena lateral del colesterol por un sistema multienzimático que lo hidroxila primero en el C20, luego en C22 y finalmente una desmolasa lo convierte en pregnenolona y ácido isocaproico. La formación de los corticoides tiene lugar por acción concertada de enzimas microsómicas y mitocondriales a partir de la pregnenolona [2].

Transporte

Los GC naturales forman complejos con las proteínas del suero. El complejo entre el GC y las proteínas séricas está en equilibrio dinámico; su asociación es espontánea y se disocia fácilmente en un medio fisiológico. Existen tres proteínas que unen GC: albúmina, α_1 -glicoproteína ácida y transcortina (tam-

bién llamada CBG, "corticosteroid binding globulin"). La afinidad de estas proteínas por los GC depende de la temperatura, es mayor a 4 °C que a 37 °C. Cortisol y CORT son unidos preferentemente por transcortina; cuando los niveles de cortisol plasmático, que normalmente son de 10-20 µg/dl, superan los 30-40 µg/dl, el exceso es transportado por la albúmina. En condiciones normales, el cortisol circula unido a transcortina en un 77,3 %, mientras que la albúmina une 15 % y el 7,7 % restante se encuentra libre. De acuerdo a la regla de la polaridad, la afinidad de transcortina por CORT es mayor que para cortisol.

La importancia de las proteínas séricas transportadoras de GC radica en que la hormona biológicamente activa es la libre y no la unida a proteínas. Este hecho se manifiesta en la mayor potencia biológica de los esteroides sintéticos, como la dexametasona (DEX), que no se unen a transcortina y se encuentran libres en la circulación [5].

En principio se reconoce a la albúmina como la más importante de las proteínas plasmáticas capaz de unir y transportar ALDO [6]. Existen también evidencias que la ALDO circula en forma no unida en una proporción de 30-40 %, el resto estaría ligado a dos proteínas: albúmina y transcortina [7].

Estructura de los receptores intracelulares

Los primeros pasos del mecanismo de acción de los GC en sus células efectoras son conocidos razonablemente bien. El esteroide se une en forma reversible a su receptor, que es una proteína intracelular oligomérica, formando una unión no cova-

lente de alta afinidad, con una constante de disociación (K_d) en el orden de nM [8]. Bajo ciertas condiciones puede sufrir un proceso de transformación (también llamado activación) mediante el cual el complejo hormona-receptor adquiere la capacidad de interaccionar con la cromatina y modificar la expresión genética [9].

A 37 °C los GC entran a la célula en segundos, probablemente por simple difusión, a través de la membrana citoplasmática [10]. La entrada mediada por transportadores puede ocurrir en algunos sistemas pero parece no tener una función reguladora.

Propiedades físico-químicas. El estudio de las propiedades físico-químicas de los complejos hormona-receptor ha revelado que existen multiplicidad de formas. Según el modelo de Sherman y col. [11], que se muestra en la figura I-2, el complejo nativo (holo-receptor o complejo no transformado), estabilizado por iones molibdato, es un tetrámero muy asimétrico con un peso molecular de 320-350 kD y un coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) de 9-10. El dímero sería un intermediario poco estable y el monómero el complejo transformado. Estos complejos podrían asociarse a ribonúcleoproteína formando agregados o bien degradarse proteolíticamente originando fragmentos menores. El menor fragmento, que contiene al sitio de unión es una estructura globular de peso molecular 20-25 kD denominado mero-receptor.

Holbrook y col. [12] analizaron los complejos formados

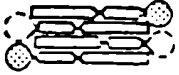
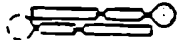

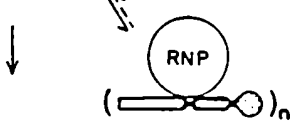
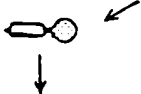

Tipo de Receptor	Modelo Esquemático	$s_{20,w}$ S	R_s nm	$PM \times 10^{-3}$	a/b Prolado
Tetrámero		9-10	8.0-8.5	320-350	12-13
Dímero		5-7			
Monómero		4-5	5.3-6.0	90-110	12-14
Agregados		> 20	> 10	> 900	
Fragmento(s) Intermedio(s)		3-4	2.5-4.0	40-70	3-7
Merorreceptor		2-3	1.9-2.4	20-25	1-3

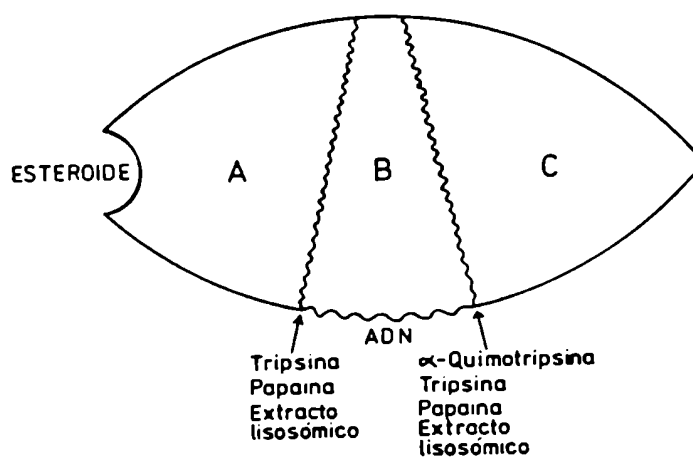
Figura 1-2 : Modelo de formas de receptor de hormonas esteroides de M. Sherman.

Se representan con círculos rellenos los fragmentos globulares que ligan la hormona, los círculos punteados indican la posible presencia de sitios adicionales. Los segmentos rectangulares denotan los fragmentos asimétricos de la molécula y las conexiones entre ellos los sitios sensibles a proteasas. RNP representa ribonucleoproteína o fragmento ribosomal que se une a un número (n) desconocido de subunidades de receptor. $S_{20,w}$: coeficiente de sedimentación, R_s : radio de Stokes, M_r : peso molecular y a/b : la relación axial de un elipsoide prolado hidrodinámicamente equivalente [Tomado de Sherman y col., J. Biol. Chem. 258 : 10366-10377 (1983)].

en timocitos enteros y estabilizados por molibdato, observando dos especies principales que identificaron como el recptor no transformado, con las propiedades hidrodinámicas del tetrámero propuesto por Sherman y col. [11], y el receptor transformado, coincidente con el monómero del mismo modelo. Un tercer componente menor fue identificado como el mero-receptor.

El receptor ha sido purificado utilizando su propiedad de unirse a ADN en su forma transformada, o por cromatografía de afinidad obteniendo la forma no transformada [13,14]. Se han obtenido anticuerpos policlonales [15] y monoclonales [16] utilizados para estudiar su estructura. Como se muestra en la figura I-3 se han determinado tres dominios [15]. El dominio A contiene el sitio de unión para el esteroide, el B el sitio de unión para el ADN y el dominio C el sitio de reconocimiento para un anticuerpo preparado en conejos contra el receptor purificado de hígado de rata. Estos tres dominios se separan por tratamiento del receptor con enzimas proteolíticas. El dominio C se puede separar de los anteriores por tratamiento con α -quimotripsina seguido de filtración en gel de agarosa o cromatografía en ADN-celulosa. La pérdida del dominio C, tal como se ha observado en ciertos clones de linfoma de ratón, resulta en resistencia a la acción hormonal.

Grupos funcionales. La inhibición de la unión del esteroide producida por el fosfato de piridoxal y la 1,2-ciclohexanodiona [17] parecen indicar la presencia de residuos de arginina y lisina que podrían estar involucrados en la unión.



Dominio A: Contiene sitio de union para el ligando.
 " B: Contiene sitio de union para ADN.
 " C: Contiene el determinante inmunológico.

Figura I-3 : Dominios del receptor de GC.

El receptor presenta tres dominios, cuyas propiedades se indican en la figura. Los tres dominios pueden separarse por acción de enzimas proteolíticas y de extractos lisosómicos. [Tomado de Carlstedt-Duke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 4260-4264 (1982)].

El receptor de GC es una molécula fosforilada. Las primeras evidencias de la fosforilación del receptor fueron aportadas por Munck y col. [18] que propusieron un reciclado de receptores dependiente de la carga energética de la célula. Posteriormente se comprobó el efecto de las fosfatasas y sus inhibidores [19,20] sobre la capacidad de unión del receptor y su transformación. La presencia de grupos fosfatos en el receptor no transformado quedó demostrada por marcación con ^{32}P y análisis por electroforésis en geles de poliacrilamida [21].

Los receptores de GC de hígado y timo son sensibles a reactivos de grupos sulfhidrilos. El tratamiento de los receptores libres con estos agentes inhibe la unión del esteroide. También se encontró que reactivos específicos de grupos sulfhidrilos inhiben la unión del complejo transformado a ADN-celulosa. Estudios realizados utilizando cromatografía sobre matrices reactivas con sulfhidrilos evidenciaron la presencia de sulfhidrilos diferentes involucrados en la unión del receptor con el esteroide y del complejo transformado con el ADN [22].

Factores estabilizantes de los receptores

Los reactivos reductores, protectores de sulfhidrilos, tales como el ditiotreitól (DTT) y el 2-mercaptoetanol estabilizan las preparaciones de receptor de acuerdo al requerimiento de estos grupos. Otros factores agregados rutinaria-

mente a los medios de incubación son el glicerol que disminuye la disociación de la hormona del complejo, y el EDTA que al secuestrar cationes divalentes inhibe las proteasas calcio-dependientes.

Otro factor estabilizante muy utilizado a partir de las observaciones de Pratt y su grupo [19] es el molibdato y otros oxianiones de los metales de transición del grupo VI A como el tungstato y el vanadato. Este efecto protector puede atribuirse a diversos factores tales como la inhibición de fosfatasas y proteasas y también a través de una interacción directa con el receptor [23].

El laboratorio de Pratt ha descrito la presencia de un factor endógeno termoestable que impide la inactivación (pérdida de la capacidad de unir al esteroide) y la transformación [24, 25]. Este factor ha sido identificado como tioredoxina, planteándose que la inactivación y la transformación son procesos sensibles a una reductasa tioredoxina-dependiente [25].

Otro factor termoestable impide la degradación de los complejos hormona-receptor en citosoles de timo y células de leucemia linfocítica aguda. Se comprobó que este factor es la calpastatina, inhibidor natural de una familia de proteasas neutras calcio-dependientes denominadas calpaínas [26].

Transformación del complejo hormona-receptor

La proteína receptora puede ser considerada como el verdadero mediador en la acción de los GC. La hormona sería un

ligando alostérico que promueve la transformación del complejo hormona receptor a su conformación con mayor afinidad por el ADN. Este evento fue descrito primero en sistemas libres de células, existiendo actualmente evidencias que ocurre en células intactas [27]. Estos estudios han sido realizados utilizando la propiedad de los receptores no transformados que quedan más retenidos en intercambiadores aniónicos que los transformados. Esta propiedad es consecuencia de la exposición de cargas positivas sobre la superficie de la molécula que ocurre en la transformación, favoreciendo la interacción con polianiones, entre ellos el ADN. La resolución de estas formas de receptores ha sido facilitada por el hallazgo que el molibdato bloquea en forma reversible la transformación [28]. La disponibilidad de anticuerpos contra receptores ha hecho posible, por medio de la microscopía de inmunofluorescencia, demostrar que el receptor se encuentra en el citoplasma y se transloca al núcleo en presencia de hormona en la célula intacta [29,30].

De acuerdo a lo expuesto, el receptor nativo sin unirse a la hormona existe como un oligómero en el cual la región de alta afinidad por el ADN no está expuesta. Este oligómero (posiblemente un tetrámero) puede ser un homo-oligómero en el cual todas las subunidades tienen un sitio de unión para el esteroide, o un hétero-oligómero en el cual solamente las subunidades homólogas son las que unen la hormona. En la trans-

formación se produciría una disociación del receptor oligomérico en un proceso termo-dependiente, liberándose los monómeros con el sitio de unión al ADN expuesto en su superficie [8]. El receptor no transformado está fosforilado y posee grupos sulfhidrilos reducidos, al transformarse se separaría un factor (posiblemente tiorredoxina) que estabiliza al receptor en su estado nativo e impide la transformación, y se desfosforilaría exponiendo grupos cargados positivamente de aminoácidos básicos en su superficie [24]. Este modelo basado en estudios en sistemas libres de células está de acuerdo con los estudios realizados en células enteras[12].

Modelo del ciclado intracelular de receptores

Se ha observado que el receptor adquiere la capacidad de unir al esteroide por un proceso que requiere energía pero que no es dependiente de la síntesis de proteínas [18], postulándose un modelo cíclico en la acción del receptor de GC. En la figura I-4 se ilustra tal modelo teniendo en cuenta gran parte de la información que se posee hasta el momento[8].

El receptor inactivado adquiere la capacidad de unión mediante una fosforilación catalizada por una proteína quinasas, y se inactiva mediante una desfosforilación mediada por una fosfatasa. La desfosforilación del complejo hormona-receptor promueve su transformación, liberando un factor identificado como tiorredoxina. Esta se mantendría reducida por una tiorredoxina reductasa y preservaría en estado reducido los

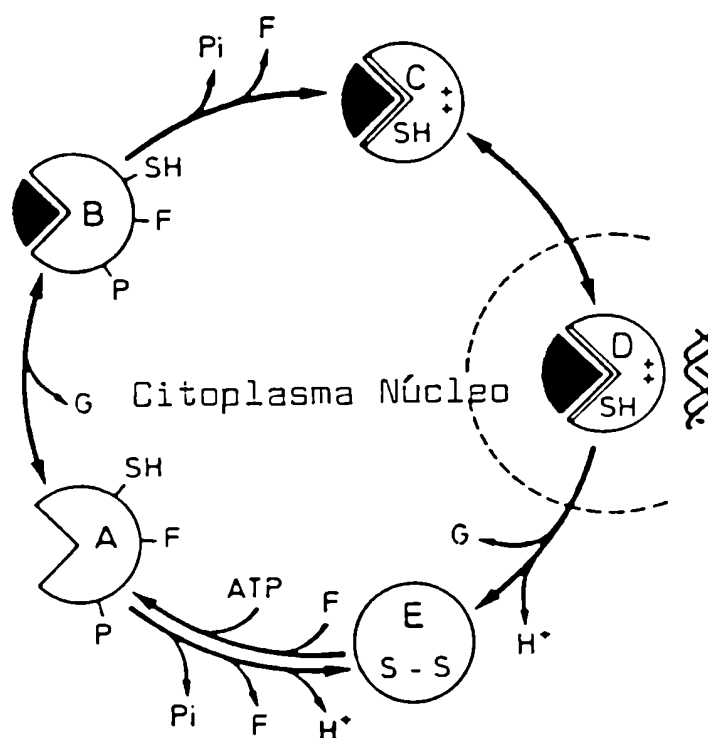


Figura I-4 : Modelo del ciclo intracelular del receptor de GC.

La unión del GC (G) al receptor libre en estado activo (A) requiere la fosforilación (P : grupo fosfato) del receptor y la disponibilidad de grupos sulfhidrilos (SH) que se mantienen reducidos por la presencia de un factor (F) que también inhibe la transformación. El complejo hormona-receptor (B) se transforma defosforilándose y liberando F. El receptor transformado (C), con cargas positivas en su superficie que facilitan su interacción con el ADN, transloca al núcleo donde se asocia al ADN de la cromatina (D). El receptor es reciclado al citoplasma en una forma oxidada (E) incapaz de unirse al esteroide si no es fosforilado (requerimiento de ATP) y reasociado a F recuperando sus grupos sulfhidrilos [Tomado de G. G. Rousseau, Mol. Cell. Endocrinol. 38 : 1-11 (1984)].

sulfhidrilos necesarios para la unión del esteroide y la transformación. La tiorredoxina mantendría ocultos restos de aminoácidos tales como lisina, arginina e histidina necesarios para la unión al ADN.

Este modelo cíclico es consistente con los estudios cinéticos de Munck y Holbrook [31] cuyo modelo también predice el comportamiento agonista o antagonista de diferentes esteroides de acuerdo a su constante de velocidad de disociación. Las relaciones biológicas de agonistas y antagonistas son matemáticamente indistinguibles de las predicciones del modelo alostérico de Sherman [32].

Regulación de la expresión genómica

Los GC controlan la expresión de genes transcripcionalmente activos aumentando o disminuyendo la concentración de ARN mensajero. Estos efectos pueden resultar de mecanismos transcripcionales o post-transcripcionales. La inducción de ARN de virus de tumor mamario de ratón (MMTV: murine mammary tumor virus) depende de la presencia de determinadas regiones en el ADN del pro-virus. Estas regiones se comportan como estimuladores de la transcripción. Los genes inducibles por GC pueden retener la sensibilidad a la hormona luego de ser transferidos a una célula heteróloga por técnicas de transfección. Los genes no inducibles pueden adquirir esta propiedad si se los liga a la región promotora de un gen inducible [9,33,34].

Sin embargo la complejidad del mecanismo o de los meca-

nismos queda evidenciada por las diferentes regiones del ADN que contienen secuencias afines al complejo hormona-receptor. Se han determinado estas secuencias cerca de las zonas promotoras de los genes inducibles en la zona anterior a la del comienzo de la transcripción (pares de bases -50 a -300), en diversas regiones del ADN transcribible, en el primer intrón de un gen inducible y en regiones muy alejadas anteriores al sitio de iniciación (a más de 2600 pares de bases) [9,33-39].

Los mecanismos propuestos para la inducción del gen de hormona de crecimiento en cultivos de células de tumor de hipófisis de ratas incluyen : (a) estimulación directa de la transcripción no dependiente de síntesis proteica; (b) estimulación de un intermediario estable que aumenta el efecto inductor de la hormona tiroidea; (c) aumento de la estabilidad del ARN mensajero; (d) alteración de la poliadenilación del RNA (figura I-5) [40].

Mecanismos de acción no genómicos

Existen en la literatura diversas descripciones de efectos de hormonas esteroideas cuyo mecanismo no es fácilmente explicable con el modelo genómico [41]. Estos efectos , caracterizados por la rapidez con que se producen, incluyen la alteración de la composición y funciones de las membranas, efectos anestésicos, modificación de la excitabilidad celular, interacción con nucleótidos cíclicos y efectos sobre el transporte de metabolitos. Para los GC se pueden mencionar la re-

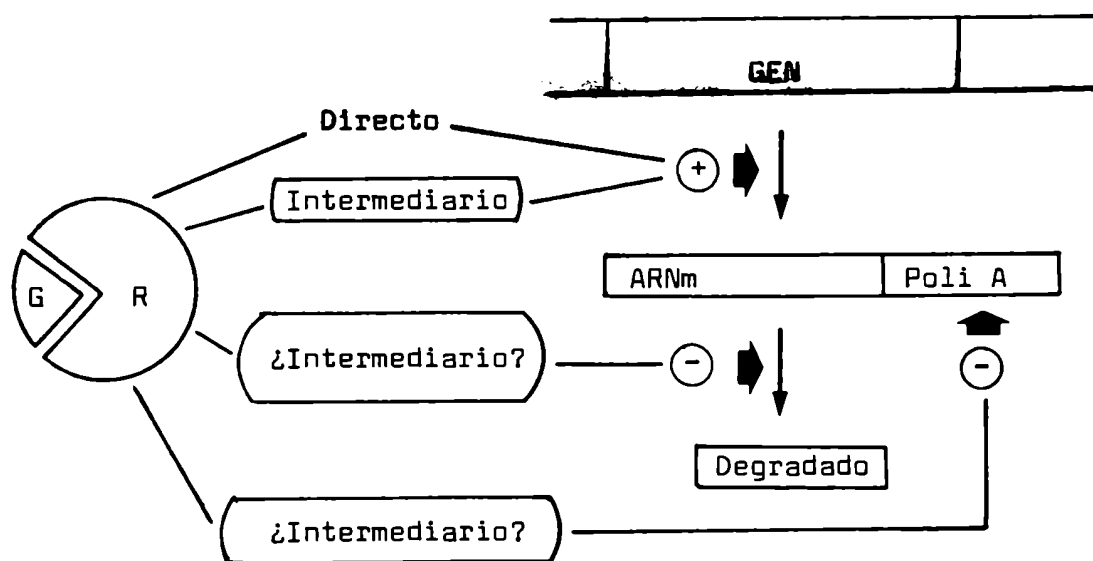


Figura I-5 : Múltiples efectos de los GC sobre la expresión genética.

El complejo hormona-receptor puede actuar al menos de cuatro maneras diferentes sobre la expresión genética del gen de la hormona de crecimiento en cultivos de células hipofisarias. Primero, influencias directas sobre la transcripción. Segundo, existe un efecto potenciador del efecto sobre la transcripción de la tri-iodotironina que tarda en aparecer. Tercero, efecto estabilizador del ARN_m. Cuarto, puede afectar la longitud de la cola de poliA. [Modificado de Lan y col., J. Steroid. Biochem. 20 : 77-88 (1984)].

troalimentación negativa rápida de la secreción de ACTH que se produce sobre los tejidos neuroendócrinos [42,43] y los efectos sobre la excitabilidad nerviosa y la transmisión sináptica [44].

Los mecanismos propuestos involucran interacciones rápidas de los esteroides con las membranas en forma directa debido a sus propiedades lipofílicas o bien por medio de receptores de membrana [41]. Towle y Sze [45] describieron sitios de unión específicos para GC en membranas sinápticas purificadas de cerebro, diferentes a los receptores citosólicos, y los relacionaron con el aumento de la captación de triptofano producido por los GC.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA MEDULA ESPINAL

CELULAS DEL SN

Neurona

Es la unidad genética, anatómica, trófica y funcional del SN. Todas las vías nerviosas, los circuitos y arcos reflejos están compuestos por unidades neuronales dispuestas de manera simple o compleja.

Cada neurona posee un cuerpo celular o soma (figura I-6) que contiene neurofibrillas, cuerpos de Nissl (masas de retículo endoplásmico granular), aparato de Golgi, mitocondrias y diversas inclusiones como pigmentos y lípidos. Del cuerpo neuronal se expanden una o más prolongaciones que constituyen las dendritas y el axón.

El axón es una prolongación larga y delgada que surge de una región de protoplasma conocida como el cono de implantación. En el extremo distal cada axón se ramifica en arborizaciones terminales, el teledendrón. El axón contiene mitocondrias, neurofilamentos, microtúbulos y retículo endoplásmico liso, pero carece de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas. Los axones pueden ser mielínicos o amielínicos. La vaina de mielina es formada y mantenida por los oligodendrocitos y está compuesta por capas concéntricas de lípidos y proteínas; está interrumpida por constricciones a inter-

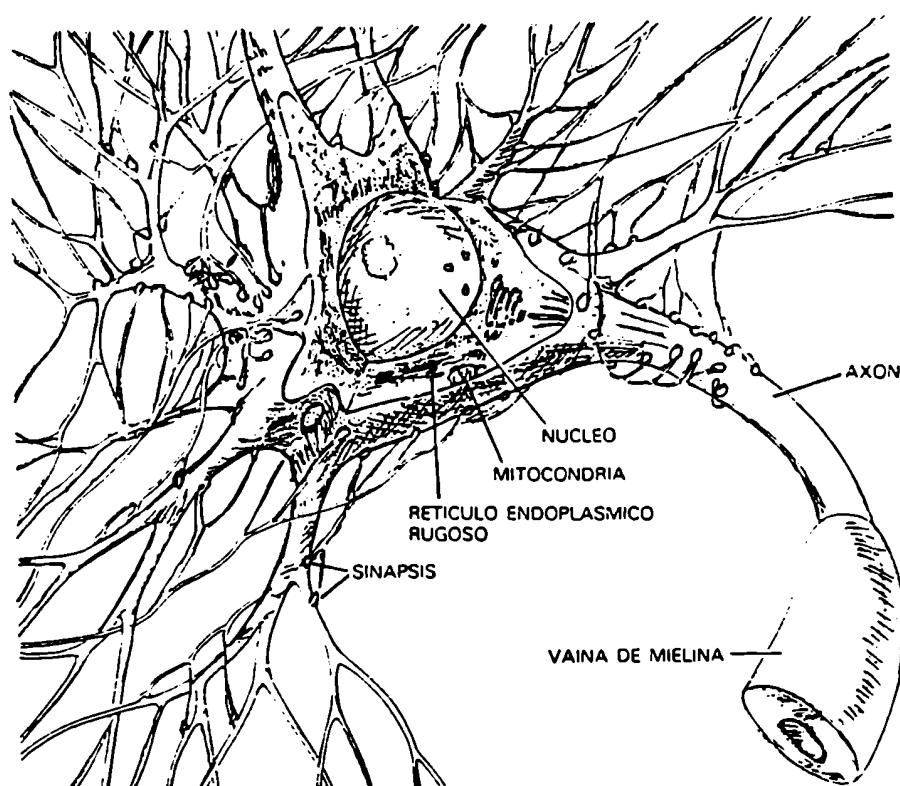


Figura I-6 : Cuerpo celular de una neurona.

Contiene material genético y el complejo aparato metabólico común a todas las células. A diferencia de la mayoría de las otras células, sin embargo, las neuronas no se dividen después del desarrollo embrionario; la dotación original de un individuo debe servir para toda la vida. Hay diversas dendritas y un único axón que sale del cuerpo celular. El cuerpo celular y las dendritas están cubiertos de sinapsis, estructuras en forma de botón donde se recibe la información de otras neuronas. Las proteínas se sintetizan en el retículo endoplásmico. Un sistema de transporte distribuye proteínas y otras sustancias del cuerpo celular a los lugares donde se requieren.[50].

valos regulares conocidos como estrangulaciones de Ranvier. En el SN periférico los axones se hallan rodeados por una membrana superficial, la vaina de Schwann [46].

Neuroglía

Está constituida por los elementos celulares que forman el tejido intersticial del SN. En los mamíferos las células de la neuroglía exceden en número a las neuronas. A diferencia de estas la neuroglía conserva toda la vida la facultad de dividirse, no genera potenciales de acción y no produce ni recibe sinápsis.

En el SNC se reconocen dos categorías de células de sostén, la macroglía y la microglía. La macroglía está formada por astrocitos y oligodendrocitos. Los astrocitos son células estrelladas con gran número de prolongaciones que desempeñan un papel importante en el flujo iónico y en la regulación del metabolismo de la neurona. Los oligodendrocitos son más pequeños y con menos ramificaciones y están involucrados como intermediarios del metabolismo neuronal, como células de evacuación y como formadoras de la vaina de mielina.

La microglía está constituida por pequeñas células con prolongaciones ramificadas, y está considerada como el sistema de "limpieza" del SN, estando sus células capacitadas para transformarse en macrófagos, migrar a través del neurópilo y autolisar o fagocitar [46].

BIOQUIMICA DEL SN

Las neuronas poseen la maquinaria bioquímica común a todas las células vivas especializándose, a diferencia de las otras células, en la transmisión de los impulsos nerviosos, lo que implica la necesidad de mantener gradientes iónicos y sintetizar y liberar un elevado número de mensajeros químicos: los neurotransmisores.

Metabolismo energético

El SNC es el consumidor de energía más activo del organismo, hecho que queda reflejado por su amplia irrigación y por su activo consumo de oxígeno. El cerebro, siendo el 2 % del peso corporal, consume el 20 % del oxígeno en reposo. Se cree que este gasto energético obedece a la necesidad de mantener unos gradientes iónicos a través de la membrana de las neuronas.

A diferencia de otras células, las neuronas no pueden utilizar en condiciones normales diversos combustibles como ciertos azúcares, lípidos y aminoácidos, dependiendo exclusivamente de la glucosa sanguínea. Tampoco pueden funcionar en anaerobiosis, dependiendo enteramente del metabolismo oxidativo.

Transporte axónico

Las neuronas del SNC del adulto no pueden ser reemplazadas y por lo tanto deben existir mecanismos que permitan la renovación de todos sus elementos, inclusive aquellos

situados a distancias considerables del cuerpo celular de la neurona.

Se ha observado un movimiento constante de proteínas y otros componentes procedentes del soma celular y dirigido hacia la sinápsis, recorriendo toda la longitud del axón. Existen distintos sistemas de transportes, lentos o más rápidos, que fluyen en ambas direcciones, de y hasta los terminales de los axones. Ambos mecanismos parecen involucrar un gran número de proteínas fibrosas observadas por microscopía electrónica.

Neurotransmisión

Cuando una neurona recibe un impulso nervioso de una célula vecina sufre una despolarización local debido a la apertura de los canales de sodio, que entra disminuyendo el potencial negativo de reposo. De esta manera se propaga el impulso a lo largo del axón y dendritas, cerrándose inmediatamente los canales de sodio y abriéndose los de potasio para restablecer el potencial negativo normal.

Cuando el impulso llega al terminal sináptico, se producen una serie de eventos que culminan en la liberación de los neurotransmisores almacenados.

Los neurotransmisores pueden dividirse en tres grupos:

- a) aminas biogénicas: catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), serotonina, acetilcolina, histamina.
- b) aminoácidos: glutamato y aspartato (excitatorios), γ -ami-

no butírico (GABA), glicina, alanina y serina (inhibitorios).

c) neuropéptidos: encefalinas, sustancia P, neurotensina, β -endorfina, adrenocorticotrofina (ACTH), angiotensina II, oxitocina, vasopresina, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina, hormona liberadora de tirotrófina (TRH), bombesina, etc.

Las moléculas de transmisor liberadas cruzan el espacio entre el terminal del axón y la membrana de la neurona receptora, interactuando sobre sus receptores específicos situados en la membrana post-sináptica. La interacción puede provocar la excitación o inhibición de una neurona, la contracción de una fibra muscular o la síntesis o secreción de una hormona en una célula glandular. Estos acontecimientos se producen por alteración de la permeabilidad de la membrana, por efecto directo del complejo neurotransmisor-receptor sobre proteínas de membrana o por mecanismos más lentos mediados por nucleótidos cíclicos.

Posteriormente la molécula de transmisor debe ser rápidamente inactivada. Algunos transmisores son inactivados por enzimas situadas en el espacio sináptico como la acetilcolina, otras como la norepinefrina, dopamina, serotonina y GABA son reabsorbidos por el terminal del axón para ser degradados o bien recuperados (figura I-7). La comprensión de las distintas etapas de la transmisión sináptica ha acrecentado al esclarecimiento del modo de acción de las drogas

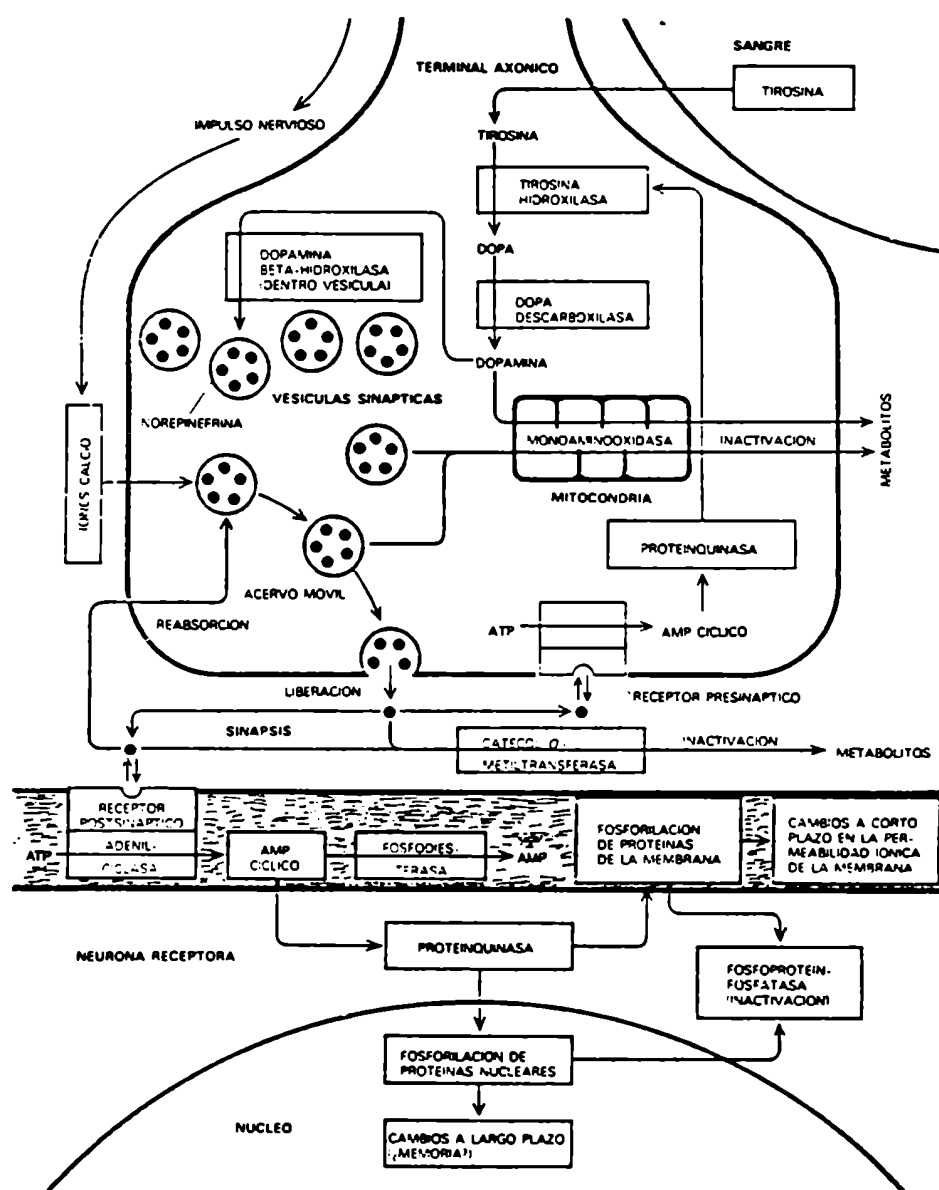


Figura I-7 : La Transmisión química.

Se representa el proceso de transmisión en una sinápsis de norepinefrina. En primer lugar el neurotransmisor se sintetiza en 3 etapas a partir del aminoácido tirosina y se almacena en vesículas. La llegada del impulso provoca la entrada de iones calcio, induciendo la liberación de la norepinefrina al espacio sináptico. Las moléculas de transmisor se unen a sus receptores específicos de la membrana post-sináptica produciendo efectos a corto plazo (eléctricos) y a largo plazo (mediados por AMP_c). El efecto termina por una rápida reabsorción hacia el pie del terminal o por degradación enzimática del neurotransmisor. Los receptores presinápticos median la inhibición de la síntesis del neurotransmisor. [47].

psicoactivas [47-49].

ANATOMIA DE LA ME

Anatomía macroscópica

La ME es una estructura larga y cilíndrica, revestida por las meninges, que se encuentra dentro del conducto raquídeo o vertebral. Se extiende desde el agujero occipital, donde se continúa con el bulbo, hasta el borde inferior de la primera vértebra lumbar. Tiene dos ensanchamientos, el cervical y el lumbar, cada uno de ellos relacionado con las raíces que inervan, respectivamente, a las extremidades superiores e inferiores. En sentido caudal al engrosamiento lumbar, la ME espinal presenta una terminación cónica, el cono medular ("conus medullaris"). Una condensación de la piamadre, que se extiende caudalmente desde el cono medular, forma el "filum terminale".

Mientras que la ME es una estructura continua, no segmentada, los 31 pares de nervios espinales asociados con regiones localizadas producen una segmentación externa. Sobre la base de esta segmentación externa, se considera que la ME está compuesta por 31 segmentos, cada uno de ellos recibe y a la vez suministra pares de filamentos dorsales y ventrales. Los segmentos medulares se encuentran divididos del siguiente modo: 8 cervicales (C), 12 torácicos (T), 5 lumbares (L), 5 sacros y 1 coccígeo en el humano y 8 C,

13 T, 6 L y 4 sacras en la rata [51].

Hasta el tercer mes de vida fetal la ME ocupa el conducto vertebral en toda su extensión, pero pasado ese momento, el crecimiento diferencial de la columna vertebral excede al de la ME. Al nacer el cono medular está próximo a la vértebra L3; en el adulto se encuentra entre las vértebras L1 y L2 y ocupa solo los dos tercios superiores del conducto vertebral. Los sitios por donde emergen los nervios espinales no varían, pero se produce un alargamiento de los filamentos radiculares entre los agujeros intervertebrales y la ME, más pronunciado para las raíces espinales lumbares y sacras. Estas raíces descienden por una distancia considerable dentro del saco dural antes de alcanzar a sus respectivos agujeros intervertebrales. El gran número de raíces lumbosacras que rodean al "filum terminale" recibe el nombre de cola de caballo ("cauda equina"). Los nervios espinales emergen desde el conducto raquídeo a través de los agujeros intervertebrales (figura I-8).

Estructura interna

En cortes transversales la ME consta de una sustancia gris central en forma de mariposa y un manto de sustancia blanca que lo rodea.

La sustancia gris contiene células nerviosas y sus prolongaciones. El predominio de neuronas, neuroglía y capilares le imparte una consistencia densa. Cada mitad de la

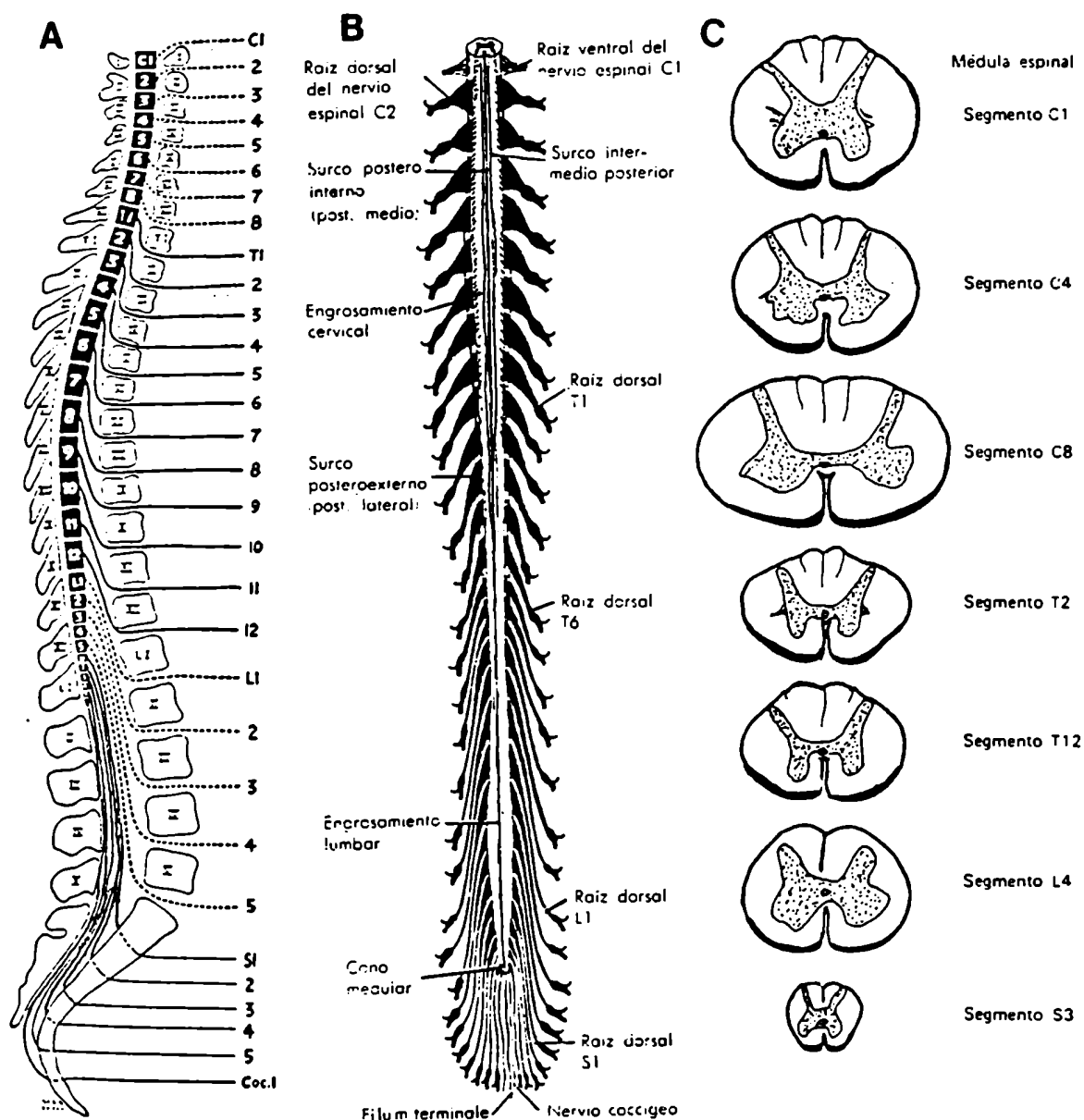


Figura I-8 : Anatomía de la ME.

A : Posición de los segmentos de la ME con referencia a los cuerpos y apófisis espinosa de las vértebras; B : vista posterior que muestra los filamentos radicales dorsales y los ganglios espinales ; C : esquema de algunos segmentos de la ME a diferentes niveles, que permite apreciar variaciones en la forma, tamaño y topografía de las sustancias gris y blanca. [46].

ME tiene una columna gris posterior (sensitiva) o asta que se extiende casi hasta la superficie y un asta o columna gris anterior (motora) que se extiende hacia adelante pero sin llegar hasta la superficie. En los segmentos torácicos se observa un asta lateral pequeña y afilada. La comisura gris, que conecta a la sustancia gris de ambos lados, circunda al conducto central o conducto del epéndimo.

La sustancia blanca, que rodea a la sustancia gris, contiene escasos cuerpos neuronales o dendritas, pero está compuesta por fibras nerviosas mielínicas y amielínicas ascendentes y descendentes y sus células neuróglas de sostén.

Los diferentes niveles de la ME muestran variaciones en cuanto forma y tamaño, en la cantidad relativa de sustancias gris y blanca y en la disposición y configuración de la sustancia gris (figura I-8). Las columnas grises alcanzan su punto máximo en los engrosamientos cervical y lumbar, que están asociados con los nervios más importantes que inervan a las extremidades [46].

FUNCION DE LA ME

El SN del humano ha heredado características específicas de cada etapa de su desarrollo evolutivo. De ellas permanecen tres niveles distintos del SN que poseen una especial importancia funcional: el nivel de la ME, el ni-

vel bajo del cerebro y el nivel cortical o cerebral alto.

Muchas de las actividades autonómicas o subconcientes del organismo, como ser el control de la presión arterial y la respiración, son controladas en la región baja del cerebro (bulbo raquídeo, protuberancia, mesencéfalo, hipotálamo, cerebelo y ganglios basales). La corteza cerebral, en cambio, es fundamentalmente una vasta región de almacenamiento de información (experiencias pasadas, formas de respuestas motoras, etc.). En ella ocurren también los procesos del pensamiento.

Reflejos medulares

La ME de los mamíferos mantiene aún las funciones de los animales multisegmentados. Las señales sensoriales se transmiten a través de los nervios espinales a cada segmento de la ME, causando respuestas motoras localizadas. Las respuestas motoras de la ME son automáticas y ocurren instantáneamente en respuesta a la señal sensorial. Además siguen ciertos mecanismos específicos denominados reflejos.

La figura 1-9 ilustra dos de los reflejos espinales más simples. A la izquierda se muestra el control neural del reflejo de estiramiento o miotático. Si un músculo es distendido se estimula un receptor y un impulso nervioso es transmitido a través de un nervio sensorial a la ME. La fibra nerviosa que transmite el impulso penetra en la sustancia gris por el asta posterior (sensitiva) y realiza

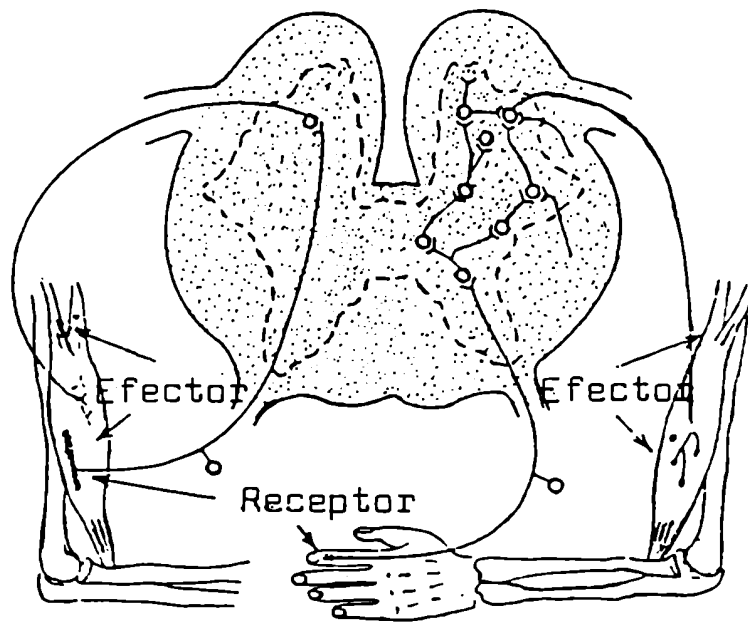


Figura I-9 : Reflejos medulares.

Esquema del camino seguido por el impulso nervioso y las sinapsis de dos tipos de reflejos medulares : a la izquierda el reflejo de estiramiento o miotático en el que se realiza un solo contacto sináptico y a la derecha el reflejo que involucra diversas conexiones neuronales.

sinápsis con una motoneurona ubicada en el asta anterior (motora). A su vez esta lo transmite a través de un nervio motor al efector, el músculo, produciendo su contracción. La contracción producida se opone al estiramiento original, por lo cual este reflejo actúa como un mecanismo de retroalimentación impidiendo variaciones en la longitud del músculo. Estos reflejos permiten a un individuo mantener las partes del cuerpo en la posición deseada pese al efecto de fuerzas externas, como la gravedad, que tienden a sacarlo de su postura. Estos reflejos reciben el nombre de anti-gravitacionales.

En la figura I-9, a la derecha, se ilustra un reflejo polisináptico: el reflejo flexor. Este es la respuesta a estímulos nocivos (dolorosos) y consiste en la contracción de varios músculos flexores e inhibición de extensores, propiciando un rápido retiro del miembro afectado del sitio de donde provino el estímulo.

Además de estos efectos se producen sinápsis a neuronas que, a través de las fibras de la sustancia blanca, transmiten la información por vías ascendentes a otras regiones del SN, que a su vez envían respuestas motoras en forma semejante por las vías descendentes de la ME.

Funciones de la ME luego de extraer el cerebro

Las funciones de la ME quedan ilustradas con las funciones reflejas que se mantienen en el "animal espinal",

luego de extraer el cerebro:

- a) El animal puede pararse. Se debe a reflejos iniciados en las plantas, cuyas señales sensoriales producen la tensión de los músculos de los miembros.
- b) Si el animal se mantiene suspendido sus miembros comienzan a hacer movimientos de marcha. Esto demuestra que los reflejos básicos de la locomoción se encuentran en la ME.
- c) Mantiene el reflejo de rascado, localizando el lugar en la piel en la que se produjo el estímulo.
- d) Se producen reflejos locales de vasoconstricción y vasodilatación en la piel (control de la temperatura).

Estos reflejos demuestran que muchas de las actividades diarias son controladas por la ME y que el cerebro tiene sobre ellas una influencia moduladora [52,53].

CORTICOIDES Y SISTEMA NERVIOSO

ACCION DE LOS CORTICOIDES SOBRE EL SN

Los esteroides adrenales ejercen cambios de gran importancia en el funcionamiento del SN. Los GC afectan el crecimiento y la diferenciación de las células nerviosas [54] y poseen influencias sobre los procesos del comportamiento [55], el sueño [56] y en la adaptación del organismo al medio ambiente [57]. El exceso de GC conduce a estados psicóticos [55] y acelera al envejecimiento nervioso [58]. Los MC regulan el balance de electrolitos y el apetito salino [59], y en ciertas circunstancias pueden intervenir en los procesos adaptativos [60]. Los GC también actúan sobre el cerebro y la hipófisis inhibiendo la síntesis y la liberación de ACTH y CRF [42,43,61].

Los GC son drogas de amplia difusión en la clínica médica. Entre las patologías del SN tratadas con estas hormonas se cuentan las lesiones, edemas y tumores intra-cra-neales [62-64]. Para ello se utilizan generalmente los corticoides sintéticos, tales como la dexametasona (DEX) y la metil-prednisolona, dada su mayor potencia debido a su resistencia a la degradación, baja afinidad a la transcortina y mayor afinidad por el receptor de GC.

Efectos específicos sobre la química y función del cerebro

Una estrategia comúnmente utilizada para detectar los

efectos

es estudiar

glándulas

de

la endotelina

no

potente las vesículas de neurotransmisión.

de acción sobre la serotonina, actuando

sobre su Aumenta la

hidroxilasa, su enzima biosintética limitante, la inco-

acción de precursor.

ción de serotonina lisosomas

El hipocampo

formado

involucrada en la interacción de

inici-

las, y sus procesos son modulados

la endotelina

extremo

forma

te con otros compuestos

tales como

de

estructura

inicial

son alteradas por la ADX restaurados por

compuestos que actúan

family

life

2-3.

404-100000

codina alindat 112. 100000

alindat

100000

caracterizados el
influencia, la velocidad de transmisión sinifí-
ca excitación aumenta con la influencia
los mismos. Alitas de excitación terminales
TA aumentan respuesta fisiológico en
esta respuesta
producen un aumento de las funciones exci-
ti a excitación. En
indicio por en
selectivo la excitabilidad del
exón donde se impulso
que concentraciones de CO₂ compatibles unán
receptor aumentaría amplitud de las respuestas
efectos anfibolitos pueden
receptoras instantánea esta
aplicación elec-
troforética polarización del potencial

RECEPCION

Relaciones

Relaciones

Relaciones

Relaciones

experimentales

de relaciones.

Relaciones

Relaciones

Relaciones

Relaciones

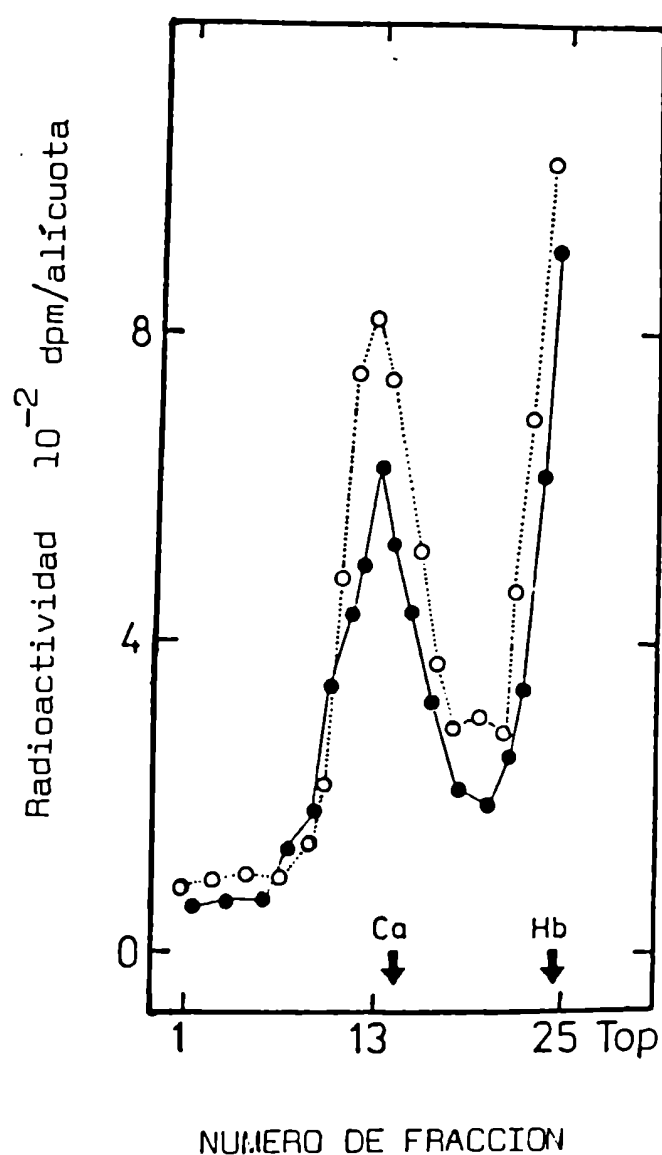


Figura I-10 : Efecto del bloqueo de los receptores de GC sobre el perfil de sedimentación de (^3H) -ALDO en citosol de HC.

La centrifugación en gradiente de glicerol fue realizada con citosol incubado con (^3H) -ALDO 10 nM solamente (○) o en presencia del bloqueante de receptores de GC, RU 26988, 100 veces en exceso (●). [Tomado de H. Coirini, tesis doctoral, 1984].

una queda determinar

ALDO redactor

El "Correio" se refiere a un "citoso"

sitio de MC

MC presenta una

en el

trial

cor

rus

distribución

- 12.10.

341-)

al

10. amiguala.

tritiadis

10. siendo menor en

nos,

la distribución central.

el

incorporación de

fin. 1/10"

1

corria

unión

cratología

y granulares

regiones sanas

individuos

tratum

la

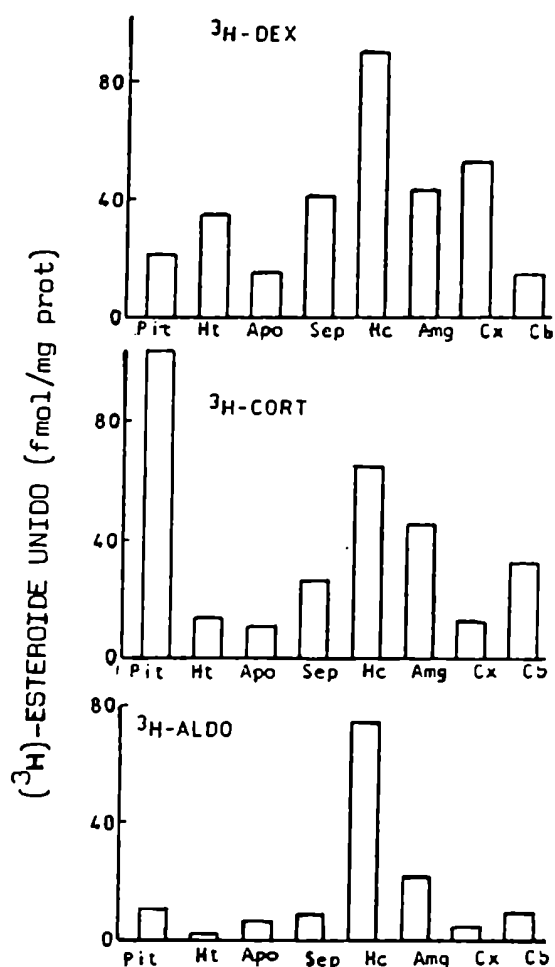


Figura I-11 : Distribución regional de receptores citosólicos para GC y MC en cerebro de rata.

Citosoles de hipófisis anterior (Pit), hipotálamo (Ht), area preóptica (Apo), septum (Sep), hipocampo (HC), amígdala (Amg), corteza cerebral (Cx) y cerebelo (Cb) fueron incubadas con los esteroides tritiados a 0-4 °C durante 4 h (CORT y DEX) o 20 h (ALDO). La hormona libre se separó de la unida por filtración en minicolumnas de Sephadex LH-20. [Tomado H. Coirini, tesis doctoral, 1984].

la distribución

concentrada en

en

norma endógena a

³H-0027 en citosol

inicial

Sin embargo, condiciones de máxima saturación nuclear, aún
persiste una fracción de los sitios citosólicos lo cual
plificaría un exceso de receptores "orfo-rinos", necesar
na mantener niveles funcionales en la célula [42].

muestra una distribución

Esos

es debido

preferencialmente hacia los

autoradiográficos indican que la cantidad

a con una buena independencia

en

mantenido

de esta.

vía

de naturales y por vía

transmisión como la

transmisión: presencia de receptores específicos

en

específicos

los

la de estas células

niveles de receptores aumentan

prolongando el tiempo

La

de estos por análisis

de eliminación

que

los sitios

hormona endógena. El

receptores es paralela al

de CORT circulante. En animales

los altos

los

de los

los

ausencia de la regulación por

partes

durante

los

estados fin



17-108

de

ha a mente estudado

como una

receptores.

gionat una gran diversidad

naí comprensión de los conserva-

los. In ellas idemio de

resor abor SN, tienen efectos

107a

e influencias consociada La re, fco

re evolución.

cción general. con

biológica.

mas cult

anterior

se caracterizar las subpoblaciones de receptores e investigar a hormonas tejido espinal. hacia fisiológica de los mecanismos de los involucrados. Los estudios realizados con este fin fueron los siguientes:

Caracterización de los sitios de unión fisiológicos para GC: se realizaron estudios cinéticos y de saturación de la unión "in vitro" y se determinó la especificidad, el efecto de relativos protectores e inhibidores, la sedimentación en gradientes de glicerol, la distribución zonal y la localización de los sitios de unión.

Transformación de los sitios de unión de GC a un estado de alta afinidad por el ADN: se caracterizaron los complejos hormona-receptor por cromatografía de intercambio iónico, unión a ADN-celulosa por la unión nucle-

saturación de GC "in vivo": se determinó la distribución

de la incorporación nuclear de DRT inyec-

iden-

de intere-

de saturación competencia, determinando su transformación.



THE PROPERTIES, DISTRIBUTION AND USE OF

THE

DE

INTRODUCCION

La importancia de las hormonas corticoides y se han localizado macromoléculas ligadoras específicas en distintas regiones mediante métodos bioquímicos y autoradiográficos. En el caso de los corticoides, los receptores se hallan preferencialmente en el sistema límbico, y el HC es el que contiene las mayores concentraciones de sitios para los GC y MC [81-84, 105]. Menores concentraciones de sitios también se encuentran en el hipotálamo, septum, amígdala, cerebelo y corteza cerebral [78, 105, 106].

Pese a los numerosos informes que describen la distribución regional, propiedades y en algunos casos la posible función de los receptores para GC en el cerebro [44, 89, 107-111], existe una única publicación acerca de la presencia de sitios de unión para GC en la ME [37], si bien existen datos en la literatura que sugieran que los GC podrían tener influencia directa sobre la fisiología de este tejido. Por ejemplo, se ha mostrado que el tratamiento con corticoides animales de experimentación produce en la transmisión sináptica y en la excitabilidad nerviosa [44], en el contenido de aminas biogénicas [98], la peroxidación lipídica [99] y en el tiempo de recuperación luego de lesiones [44], en la ME.

objetivo de esta primera parte del trabajo fue
de

unos autores describir algunas de sus propie-
dades, la cinética de la unión,
la afinidad, el equilibrio, la especificidad,
coeficiente de sedimentación, y también la distribución
zonal y las variaciones ontogenéticas.

ALIAS Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar (200-250 g) mantenidas en condiciones de temperatura constante e iluminación natural (1100-1300 ns.) y alimentadas con nutrimento Purina y agua "ad libitum". La AOX se realizó 2-3 días antes del experimento bajo anestesia con éter. Posteriormente los animales se mantuvieron con NaCl 0,9% como bebida. Para eliminar los tejidos, antes de extraer la médula se anestesiaron con éter y se flusharon con 30 ml de NaCl 0,9% fría vía intracardíaca ventricular izquierda. Luego se hizo un corte en la veña cefalica derecha, para eliminar los tejidos.

DISSECCION DEL

El ratón de cerebro [112] se utilizó con fines comparativos en las regiones, ya que está dividido en sitios [113] MC [31-34, 105]. La ME [114] se utilizó para la disección de la médula.

Los

referencia para marcar distintas regiones fueron las segundas vértebras cervicales y la espina más reciente de la segunda torácica.

10

11

tribunal

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

que esta no sea 100%

durante la-

incubación

realizá, salvo

que se especifica, a 37°C

debe

los líquidos a

macromoléculas citosólicas por filtración en minicolumnas
de Sephadex LH-20 (Sigma) de acuerdo al método de Ginsburg y col.

[115]. Se utilizaron 0.3 g de Sephadex por columna, suspendi-

do en 1 ml de "buffer" TE43 por un mínimo de 3 h. Se llena-

con 1 ml de muestra y se incuban en 37°C de 1-

tilizándose. Se remueve 0.2 ml de incubación y luego 0.1 ml

de "buffer". Esperar 5 min. y se eluyen las macromolé-

culas con 0.5 ml de "buffer" y se recien-

biendo en viales chicos. La radioactividad

la fracción en la se determinó una solución

venta 4 g de "buffer" (New England

Nuclear) con una eficiencia del 80% en

se muestra ADN. Las pro-

grafía en

precipitados.

suficiente para dar una

estabilidad. Se resolvieron en
se colocaron los tubos de vidrio se a-
a cada uno. Luego incubación
Dewar 14-20 a
una alcuota de 50 µl. Se determinó radio-
concentración de esteroide radiactivo
diferencia entre el total y el unido.
Se determinó para cada concentración
significación lineal realizada grafican-
do las incubaciones es-
tadísticas del total.
gráficos de Scatchard y sus
con regresión lineal usan-
dowlett-Parkland

En

Para

se

del 1968 -

razón

concentración uni-

concentrada

concentración compen en M. La concentración de compen-
concentración 1050_{comp}

aplicando formación logit-log curvas de compen-
concentración. Las afinidades relativas de unión (RBAs) se calcula-
con según la ecuación :

$$RBA_{comp} = (1050_{lex} / 1050_{comp}) \times 100 \quad [120]$$

1050_{lex} y 1050_{comp}

condiciones similares a las establecidas

Alfouocas de etanol de ME se incuban

con "buffer" con molibdato a 20°C du-

Alfouocas 150 µl se sembraron en gradientes

lineales de 15- 413 de glicerol en "buffer" con molibdato.

Los tubos con gradiente también se les agregaron los nin-
in

vino

(1,15) a 100 000 kg (m) 12

en m 1-13

se fraccionaron. luego se perficó el

se tubos, 10

fracciones

concentra-

20-10-11

1000

10

los gradientes

en presencia de 2,6-diclorofenol

1000

graficar

1000

10

1000

estencia

De los

estudio con el

187.11

la los estadios finales
total

sin molibdato solo 20 mM. A 30 °C la unión ^{99m}Tc -DTPA
alcanzó equilibrio a las 20 de incubación.

dose hasta por lo menos 30 h (resultados la
ausencia de molibdato en la homogenización e incubación re-
en una disminución a unión

de equilibrio. A 20 en in-
stados fueron reducidos
aproximadamente 2

presencia la unión

a (figura Los a se cambio
con similares mic-

afin

igual de 40
minutos

conteniendo no ibupro.

figura la curva

en presencia de no El máximo

$(P_1) = \{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z\}$

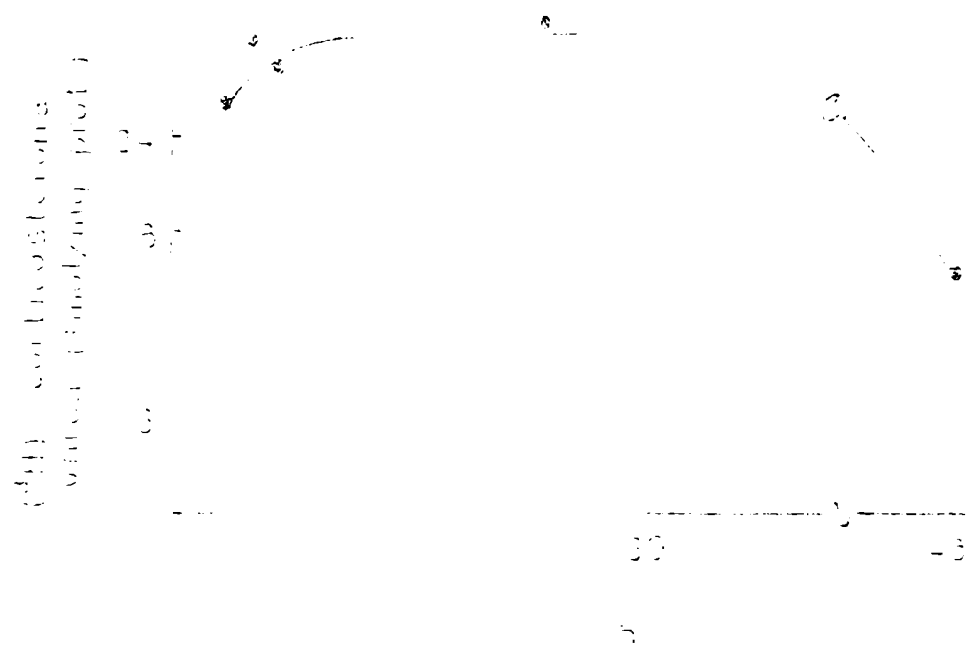
$(P_2) = \{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z\}$

$(P_3) = \{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z\}$

$(P_4) = \{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z\}$

$(P_5) = \{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z\}$

$(P_6) = \{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z\}$



La reacción $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$ se estudió en un reactor de flujo continuo a 1000 K. Se midieron las velocidades de reacción y se obtuvieron los siguientes datos:

$1/T$ (K ⁻¹)	$\log k$
30.0	10.5
31.0	9.5
32.0	8.5
33.0	7.5
34.0	6.5

la unión se alcanzó entre las 6 y las 28 h. Las incubaciones
equilibradas con 3H -CORT en estas
estas condiciones

EFECCIÓN DE PROTECTORES ENCONTRANTES DE GRUPOS SULFIDRILICOS
El requerimiento de un protector de grupos sulfidrilicos
en la "buffer" incubación ha sido demostrada, ya que la
presencia de mercaptoetanol 2 mM en el "buffer" aumenta la u-
nión en aproximadamente 30% (control: 49,6 fmol/mg proteína,
con mercaptoetanol 53,7). Además la unión no fue detectable
incluyendo "buffer" incubación bloqueantes de grupos
sulfidrilicos tales como N-ethylmaleimida (2 mM) o o-cloromer-
curibenato (1 mM), en ausencia de mercaptoetanol.

ESTUDIOS DE SATURACION

El análisis de saturación de 3H -CORT se realizó utili-
zando concentraciones entre 0,2 y 30 nM y citosol de HEP-2c.

La figura 11-3 muestra la existencia de una única pobla-
ción de sitios de unión con una alta y baja capacidad. En
4 experimentos los parámetros de unión determina-
dos fueron: B_{max} = 151 \pm 13 fmol/mg proteína
 K_d = 12 nM.

Utilizando el ligando 3H -CORT 3-22 nM (figura 11-4)
se obtuvo un sitio de unión con K_d = 12 fmol/mg proteína y K_d = 12 nM.

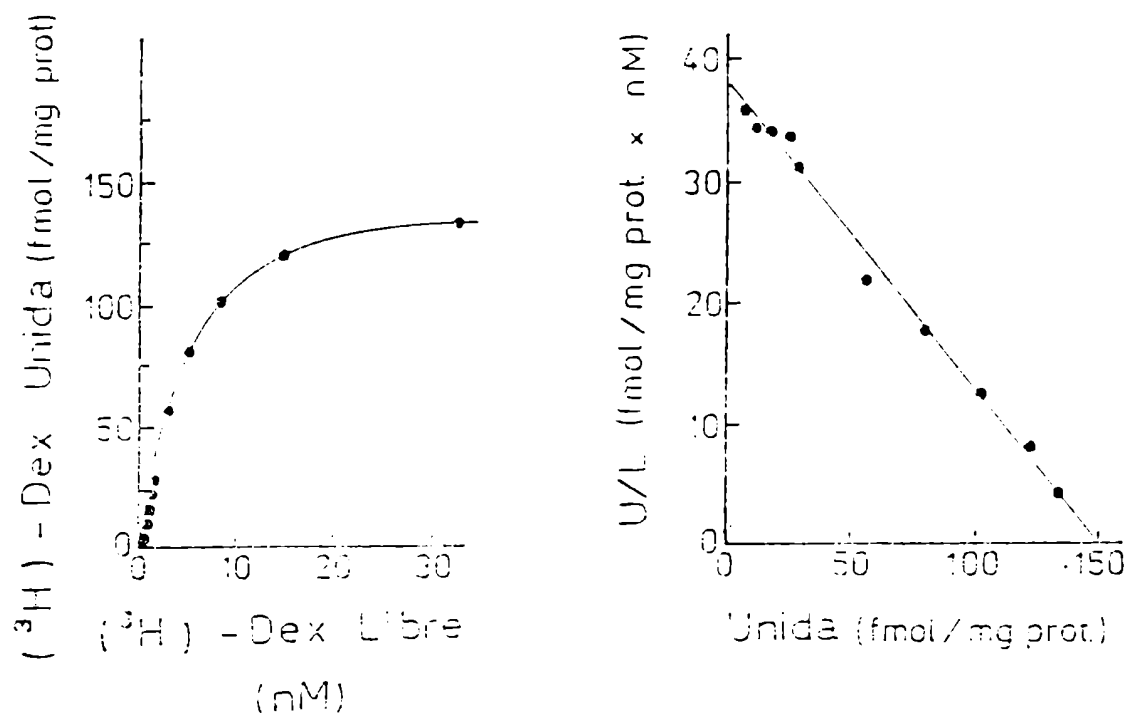


Figura 11-3 : Análisis de saturación de la unión de (^3H) -DEX en citosol de ME.

En estos experimentos se incubó citosol con (^3H) -DEX 0.2-30 nM durante 10 min a 25°C en presencia de polibridio 10 mM. El gráfico de la izquierda muestra la curva de saturación y el de la derecha la representación de Scatchard de los mismos datos. En este experimento el K_{max} fue 140 fmol/mg proteína (intervalo de confianza 95%: 142-157) y K_{d} = 0.30 nM.

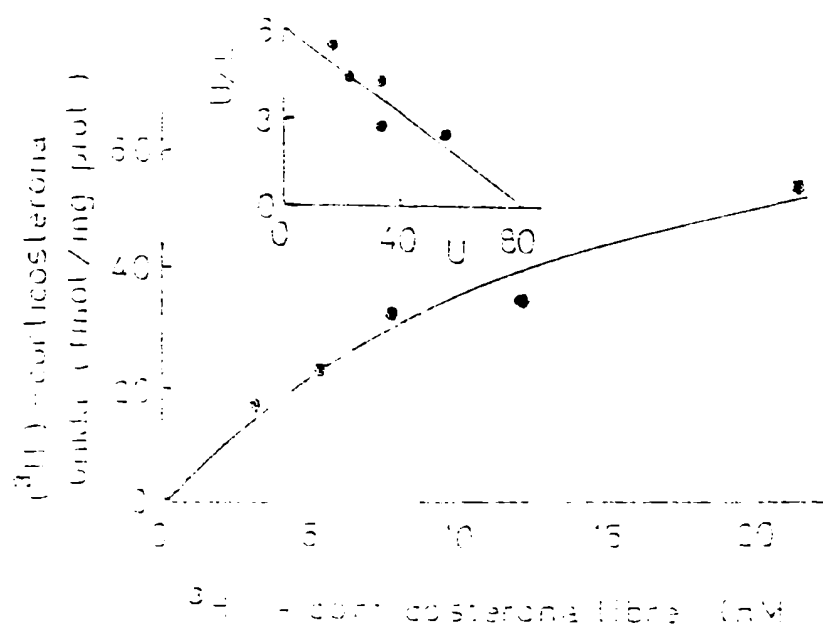
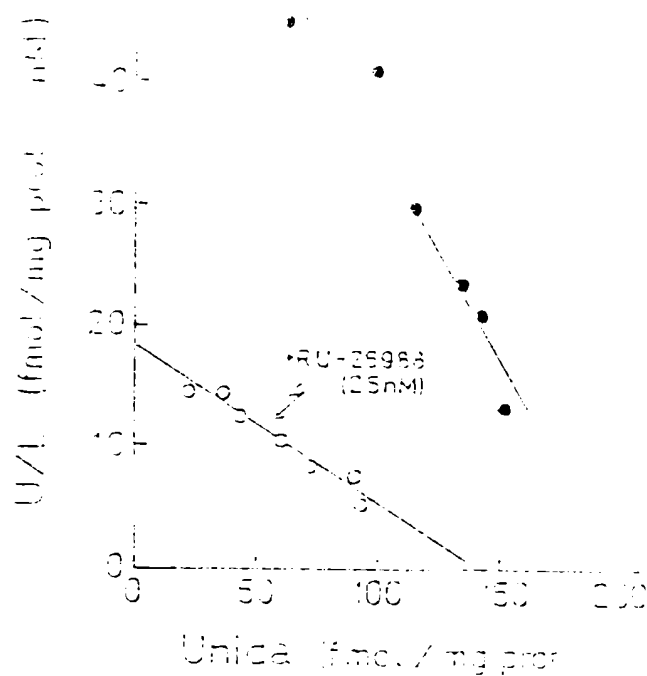


Figura 10-1. Efecto de saturación de ^3H de ^3H -cholesterol en la ME. Se incubó 100 μg de ME entera con cantidades variables de ^3H -cholesterol (1-10 nM) durante 10 h a 0°C en presencia de monovalente, 10 mM. En el gráfico se muestra la curva de saturación de ^3H -cholesterol en la ME. La correspondiente representación de saturación de ^3H -cholesterol en la ME es de 12 fmol/mg proteína y la K_d es de 10 nM.

ESTUDIOS DE COMPETENCIA

La especificidad de los sitios de unión de (^3H)-DEX en citosol de ME se investigó incubándolo con el ligando radioactivo y un rango (10-1 000 nM) de potenciales competidores. En la figura 11-5 se observan las curvas de competición resultantes y los RBAs calculados a partir de ellas para los 3 esteroides ensayados. El orden de competencia fue : TA > DEX >> RU 26988 >> CORT = progesterona > ALDO >> estradiol = testosterona, demostrando buena especificidad para GC activos y para la progesterona, un bloqueante del receptor de GC [80,123].

La inhibición producida por el GC puro [82,124] RU 26988 (11 β ,17 β -dihidroxi-17 α -(1-propinil)-androstan-1,4,6-trien-3-ona, obsequio del Dr. J. P. Raynaud, Roussel Uclaf) se estudió en 3 experimentos, en los cuales se realizaron curvas de saturación de (^3H)-DEX en presencia o ausencia de RU 26988 25 nM, concentración que produce 50% de inhibición de la unión aproximadamente en el rango estudiado. La figura 11-6 es un gráfico de Scatchard de uno de los experimentos, en ellos la presencia de RU 26988 alteró ambos parámetros de unión, disminuye B_{max} de 165 \pm 33 a 122 \pm 13 fmol/mg proteína ($p < 0.05$, test de apareado) y aumentando la K_d de 2.9 \pm 0.2 a 7.6 \pm 1.0 nM ($p < 0.05$), sugiriendo una inhibición de tipo mixto.



Efecto del RU 28986 sobre $[^3H]$

En todos los experimentos se incubó el alcohol en TEM con el ligando con $[^3H]$ durante 10 a 30 min, en presencia o ausencia de RU 28986. El gráfico es la representación de Scatchard: la línea control es la línea de relación de saturación de la unión en las incubaciones control (sin RU 28986) y los vacíos de las incubaciones con RU 28986. En este experimento el B_{max} del control fue 196 fmol/mg proteína (intervalo de confianza 95% 172-169) y con RU 28986 el B_{max} fue 11.6 fmol/mg proteína (intervalo de confianza 95% 10.2-13.0). El K_d del control fue 1.3 nM y el de RU 28986 fue 15.3 nM.

SEDIMENTACION EN GRADIENTES DE GLICEROL

La sedimentación y las propiedades de los sitios de unión de DEX en la ME se realizó por centrifugación en gradientes de glicerol, conteniendo molibdato 20 mM. La figura II-7 ilustra los picos. Únicos y simétricos, poseen en los gradientes, los cuales desaparecen por co-incubación de ligando radioactivo con un exceso de DEX no radioactiva. El coeficiente de sedimentación de (^3H)-DEX unida en citosol fue 9.6-9.8, valor similar al mostrado previamente por el receptor de GC del HC [34].

DISTRIBUCION CORTAL

Para comparar las concentraciones de sitios de unión de (^3H)-DEX de la ME con las de otras regiones del sistema nervioso, citosoles de ME, HC, protuberancia y bulbo raquídeo, se incubaron durante 22 h a 0 °C con (^3H)-DEX 10 nM en presencia de molibdato. Como muestra la tabla II-1, la unión en la ME fue aproximadamente la mitad de la del HC, similar a bulbo raquídeo y ligeramente superior a la de la protuberancia.

La figura II-3 muestra un análisis de saturación comparativo entre los sitios de unión de la ME y el HC. En tres experimentos no hubo diferencias significativas en la K_d (1.9 ± 1.3 nM en la ME y 2.9 ± 0.4 nM en el HC), pero sí en el número de sitios que fue 40% menor en la ME ($173 \pm$

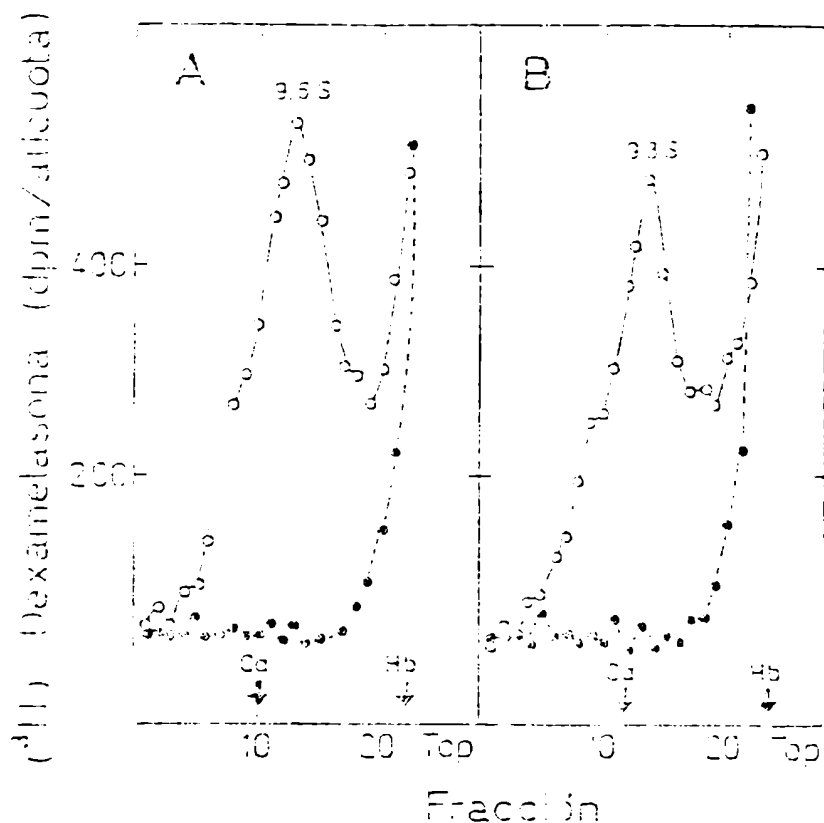


Figura 17.- Centrifugación en gradientes de glicerol de (^3H) -DEX unida en citosol de ME.

El citosol fue incubado con (^3H) -DEX 30 nM durante 3 h a 0°C en TEMD conteniendo no lo más 10 nM; alícuotas del mismo fueron colocadas sobre gradientes de glicerol 15-41% conteniendo molibdato 20 nM, centrifugadas a 200 000 g durante 12 h a 0°C . A y B son los perfiles de distribución de (^3H) -DEX en citosol de las células referidas incubadas con ligando etiquetado solamente (círculos vacíos) o en presencia de un exceso 1 000 veces mayor de DEX no radiactiva (●). Ca: catalasa de hígado bovino (11,3 S); Hb: hemoglobina de sangre humana (4,4 S).

Tabla II-1 Unión ^3H -DEX en regiones del SNC.

Región	n	(^3H)-DEX unida (fmol/mg proteína)
HC	7	155.3 \pm 15.7
Protuberancia	6	63.3 \pm 12.3
Bulbo raquídeo	6	35.0 \pm
ME	15	88.6 \pm 7.1

Citosol de las regiones del SN fueron incubadas en "buffer" TEMG (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 1.5 mM, mercaptoetanol 2 mM, glicanol / molibdato sódico 20 mM, con ^3H -DEX 10 nM durante 30 h a 0°C. El esteroide libre fue separado del unido en columna de Sephadex LH-20 [116].

n : número de animales estudiados, se representan las medias.

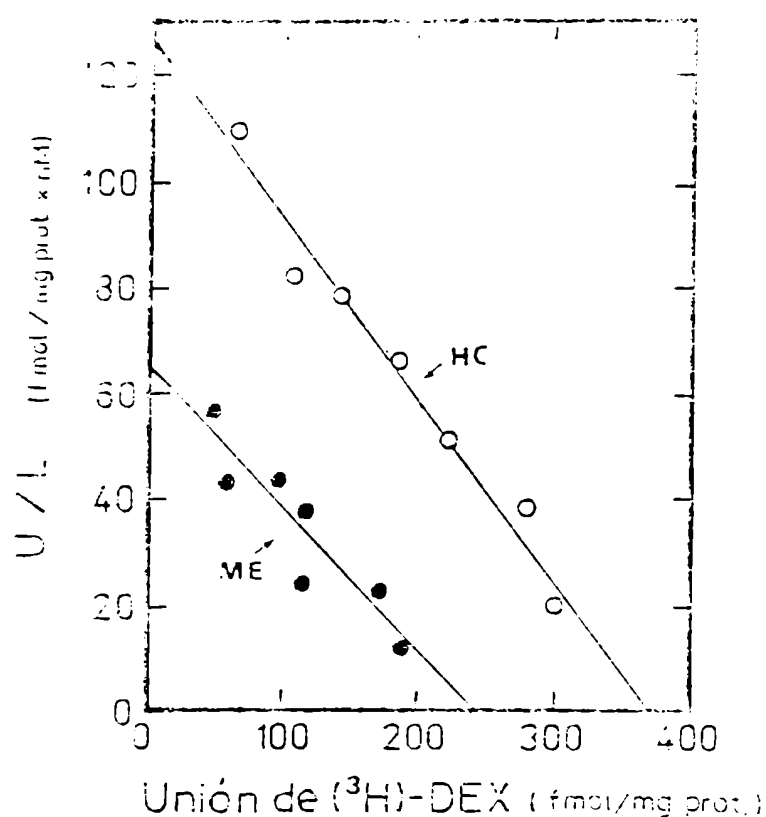


Figura 11-3 : Análisis de saturación de la unión de $(^3\text{H})\text{-DEX}$ en ME y HC.

Se incubaron citosoles de ME y HC en TEMG con molibdato a $0-4^\circ\text{C}$ durante 22 h, en presencia de $(^3\text{H})\text{-DEX}$ 0,5-1,5 nM. Se realizaron incubaciones paralelas con un exceso (1 000x) de DEX no radioactiva para determinar la unión específica. La hormona libre fue separada en minicolumnas de Sephadex LH-20. Se muestra un experimento representativo con K_d (nM) 3,3 en la ME (o) y 2,9 en el HC (o) y N_{max} (fmol/mg protefina) de 148 y 367, respectivamente.

37 fmoI/mg proteína versus 297 ± 50 fmoI/mg proteína, $p < 0.05$).

En otros experimentos la distribución de los sitios de unión fue determinada en cinco zonas de la ME. En la figura II-9 se observa que existen mayores concentraciones en las regiones que contienen los engrosamientos cervical (zona B) y lumbar (D); y por ANOVA y el test de Newman-Keuls existen diferencias significativas entre estas regiones y la zona E, que contiene la cola de caballo y el "filum terminale", con el menor número de sitios. Las otras regiones estudiadas, las zonas A y C, presentaron concentraciones menores, pero no significativamente, a aquellas regiones que contienen los engrosamientos cervical y lumbar.

ONTOGENIA

Los resultados de la figura II-10 comparan el número de sitios de unión de (^3H)-DEX en citosol de ME de ratas de distintas edades. En estos estudios se utilizaron dos métodos diferentes. En el primero se utilizaron animales con las adrenales intactas, por lo que fue necesario adaptar un método de intercambio usado previamente en nuestro laboratorio [125,126] para determinar sitios totales, y no libres, a la ME. Citosol de ratas ADX se dividió en dos alícuotas; una de las mitades se preincubó con CORT 10 nM, que es una concentración similar a la que circula en forma libre en la

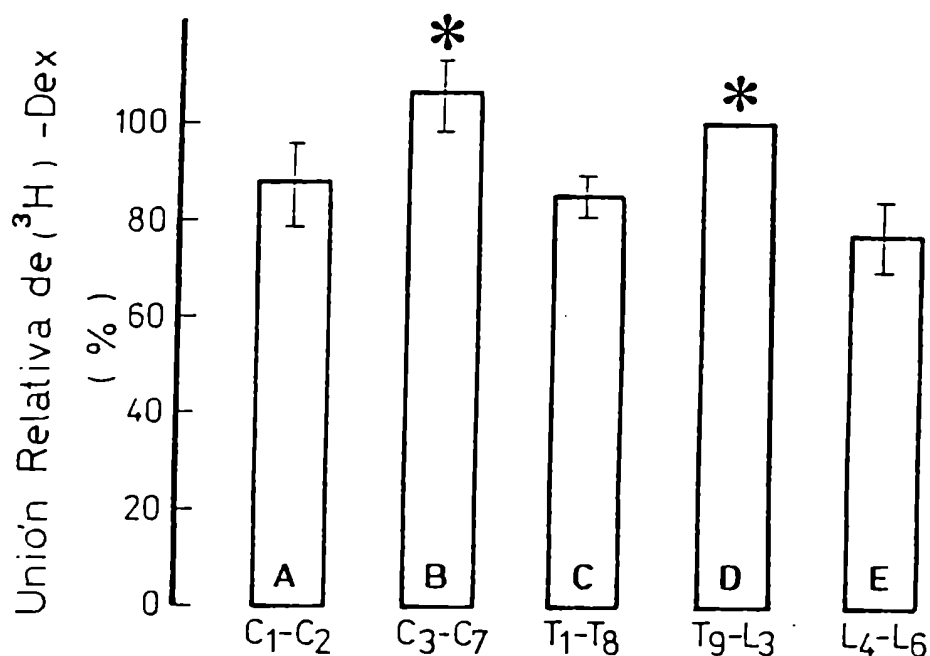


Figura II-9 : Distribución zonal de los sitios de unión de (³H)-DEX en la ME.

La unión se estudió luego de incubar citosol con (³H)-DEX 10 nM durante 22 h a 0 °C en TEMG con molibdato. La disección de la médula se realizó en secciones comprendidas entre las vértebras: sección A: C1-C2; B: C3-C7; C: T1-T8; D: T9-L3 y E: L4-L6. Las secciones B y D contenían los engrosamientos cervical y lumbar, mientras que la sección E contenía la cola de caballo y el "filum terminale". Los resultados se expresan como % de unión respecto a la sección D, que se tomó como 100. Cada columna representa la media + E.S. de seis experimentos, cada uno de ellos realizado con el tejido obtenido de dos médulas.

* : $p < 0,05$ vs. unión en la sección E.

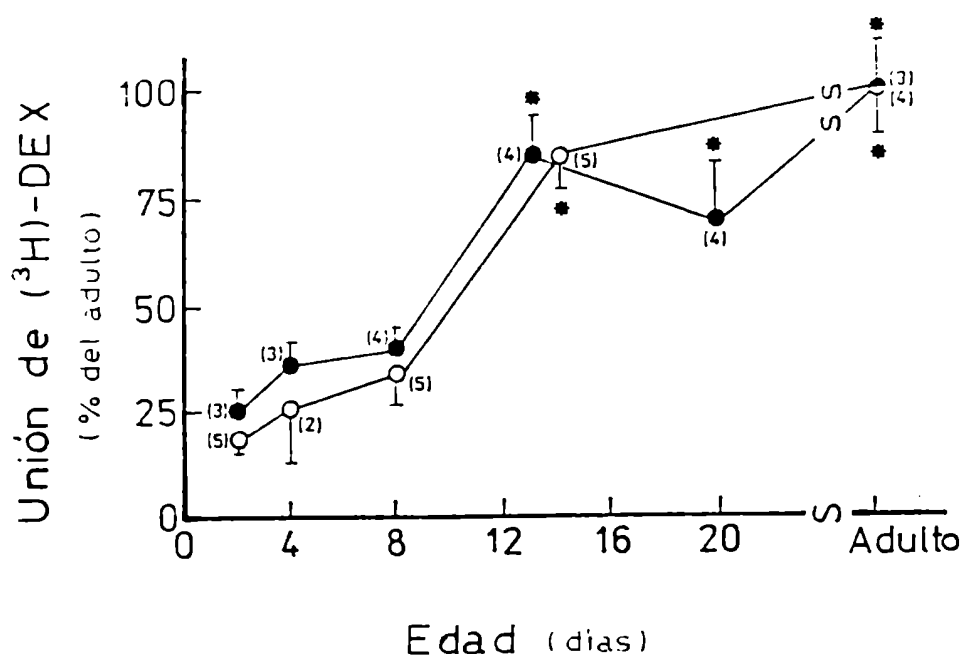


Figura II-10 : Ontogenia de la unión de (^3H)-DEX en la ME.

Se utilizaron ratas con adrenales intactas (●) de las edades que se indican en la abscisa. La unión total se determinó en citosoles incubados con (^3H)-DEX 30 nM durante 3 h a 20 °C, en TEMG con molibdato. Este procedimiento permite aproximadamente un 90% de intercambio entre los corticoides endógenos unidos y el ligando tritiado (ver Resultados). También se utilizaron ratas ADX (○), determinando la unión a 0 °C 22 h, con (^3H)-DEX 20 nM. Se representa la media y el E.S.

* : $p < 0,05$ vs. la unión a los 2, 4 y 8 días del respectivo grupo.

rata [5] y satura al receptor de GC del cerebro [78,91], durante 60 min a 0 °C; la otra mitad fue preincubada sin agregados. Luego ambas alícuotas fueron incubadas con (³H)-DEX 30 nM durante 3 h a 20 °C en presencia de molibdato 20 nM. La unión en el citosol preincubado con CORT fue el $38 \pm 6 \%$ (n=3) del control, demostrándose así un intercambio casi completo.

En el segundo método se utilizaron ratas ADX 24 h antes, y la determinación de los sitios de unión se realizó siguiendo la técnica utilizada para el citosol de adultos ADX (materiales y métodos). Con ambos procedimientos se detectaron pocos sitios a los 2 y 4 días de edad, y un pequeño aumento apareció en el octavo día. En los días 13-14 los sitios de unión alcanzaron el nivel de los animales prepúberes (20 días) y adultos.

DISCUSION

Estos resultados , en concordancia con el trabajo de Clark y col. [97] demuestran que la ME contiene sitios de unión para (^3H)-DEX semejantes a los receptores de los GC descritos en otras regiones del SN. Al igual que el receptor del cerebro la unión en la médula fue dependiente del tiempo, mostrando estabilidad a 0 °C y siendo rápidamente inactivado a 20 °C [80,127,128] . El molibdato aumenta la unión y la estabilidad de la misma especialmente a alta temperatura, lo cual coincide con las propiedades de los receptores de hormonas esteroides [125,129] . Los receptores de esteroides son considerados actualmente fosfoproteínas que el molibdato activa impidiendo su defosforilación [20,21, 129] , en vista de su capacidad para inhibir fosfatasas [19]. Además el molibdato puede estabilizar a los sitios de unión por inhibición de la proteólisis como mostraron Sherman y col. [11] en órganos efectores de los GC.

Los sitios de unión de GC en la ME pueden diferenciarse de las proteínas plasmáticas que unen esteroides ya que la (^3H)-DEX no es unida en el plasma de rata [114,115] y además por el hecho de requerir grupos sulfhidrilos intactos que no intervienen en la unión en suero [80] . En concordancia con informes anteriores sobre el receptor de GC del cerebro [80,128], la unión en la ME fue notoriamente disminu-

da por los bloqueantes de sulfhidrilos p-cloromercuribenzoato y N-etilmaleimida.

La unión de (^3H)-CORT mostró una afinidad menor que la de (^3H)-DEX y un número de sitios similar. Estos datos coinciden con la afinidad que se obtiene a partir de la RBA ($K_{d_{\text{comp}}} = K_{d_{\text{dex}}} \times (100/\text{RBA}_{\text{comp}})$) por lo que se podría deducir que "in vitro" (^3H)-CORT y (^3H)-DEX comparten un mismo sitio específico para GC. Además la afinidad menor de la CORT el GC natural de la rata, es consistente con la RBA en citosol de hígado y timo de la rata, que es aproximadamente la cuarta parte que la de DEX luego de una incubación prolongada a 0 °C [120,130] .

La RBA de la ALDO (7,1%), la testosterona y el estradiol (<1%) fue baja, evidenciando que estos no son los ligandos naturales de estos sitios de unión. La relativa potencia de la progesterona para competir con la unión de (^3H)-DEX es consistente con su actividad de bloqueante del receptor de GC y anti-inductor, lo cual es un hallazgo frecuente en diversos sistemas experimentales, incluyendo cerebro [80,123].

Los efectos del RU 26988, un GC puro [82,124] se estudiaron por saturación utilizando una única concentración de RU 26988 variando la concentración de (^3H)-DEX, y por desplazamiento de la unión de una concentración fija de (^3H)-DEX con RU 26988 en un rango de 10-1 000nM. Ambos estudios evidencian un comportamiento no competitivo, como queda refle-

jado en la variación de N_{max} y de K_d , y por la diferente pendiente del RU 26988 respecto a los demás competidores. Esta inhibición mixta puede explicarse según un modelo alostérico de Sherman del sitio de unión en el cual el competidor puede unirse a un segundo sitio alterando la ocupación del ligando trazador [32]. Alternativamente puede postularse la presencia de una población de sitios de unión compleja, con sitios que reaccionan de una manera diferente a ligandos y competidores. La heterogeneidad de receptores ha sido un hallazgo frecuente en otras regiones del SN [83,89,105].

Los perfiles de unión en los gradientes de glicerol, fueron simétricos evidenciando que en presencia de molibdato no se degradaban y la especie identificada corresponde al receptor nativo (no transformado) u holoreceptor, similar al encontrado en otros tejidos [11,12,84].

La concentración de los sitios de unión en la ME fue la mitad de la mostrada por el HC, una región reconocida por su alto contenido de receptor GC [105]. El bulbo raquídeo y la protuberancia tuvieron valores semejantes a los de la médula, que a juzgar por resultados anteriores podría tener cantidades superiores a otras regiones del cerebro sensibles a los GC [84]. Dentro de la ME hubo tendencia a una mayor unión en los engrosamientos cervical y lumbar enriquecidos en sustancia gris y una disminución en la zona terminal, que comprendía principalmente fibras nerviosas (L_4-L_6 ,

cola de caballo y "filum terminale"). La detección de sitios en esta región prueba que la sustancia blanca es tejido blanco de los GC. En forma semejante a lo que sucede en el nervio óptico [65] , en la ME los sitios podrían originarse en las células gliales. La mayor unión detectada en los engrosamientos sugiere que los cuerpos neuronales de la sustancia gris podrían ser también efectores.

El desarrollo de los sitios con la edad en la ME recuerda la ontogenia del receptor GC del cerebro. En la médula la concentración de sitios fue baja después del nacimiento aumentando lentamente hacia el final de la primera semana y luego más rápidamente hasta alcanzar los valores del adulto en la segunda semana. Olpe y McEwen [94] informaron que la concentración de sitios de unión de (^3H)-DEX en el hipotálamo y el HC fue mínima al primer día y luego aumentaba hasta el día 15 en que alcanzaban los valores del adulto.

La caracterización de los sitios de unión de los GC en la ME sugiere que la acción de estas hormonas puede mediar por estos sitios. En la literatura existen informes que aseveran que los corticoides influyen en el funcionamiento de la ME. En una revisión realizada por Hall [44] se resumen las evidencias existentes de la acción de los GC sobre la excitabilidad nerviosa y la transmisión sináptica, determinada por métodos electrofisiológicos. En la

región lumbar, altas dosis de metilprednisolona modificaron los potenciales de reposo de las motoneuronas de la médula de gato con hiperpolarización de membrana [44]. Los GC modifican la síntesis, liberación y recaptación de los neurotransmisores [44], Hall y McGinley [98] observaron que una única dosis de metilprednisolona tiene marcados efectos sobre el contenido de aminas biogénicas en la médula lumbar, Otros investigadores demostraron que los corticoides promueven la recuperación funcional luego de lesiones de la ME [44] y que son de valor en el tratamiento de enfermedades degenerativas[131]. Este último efecto puede estar relacionado con la observación de que administrando altas dosis de GC se inhibe la peroxidación lipídica en la ME [99] .

Experimentos posteriores deberán demostrar si el mecanismo clásico de acción de hormonas esteroideas que incluye dos pasos, la unión del esteroide al receptor y la traslocación al núcleo del receptor transformado, es el que actúa en la médula. De lo contrario, puede ser necesario postular un mecanismo no genómico para explicar los efectos rápidos de los GC sobre las funciones electrofisiológicas de la ME [44], mediado por una interacción previa de la hormona con su sitio de unión [132,133].

•

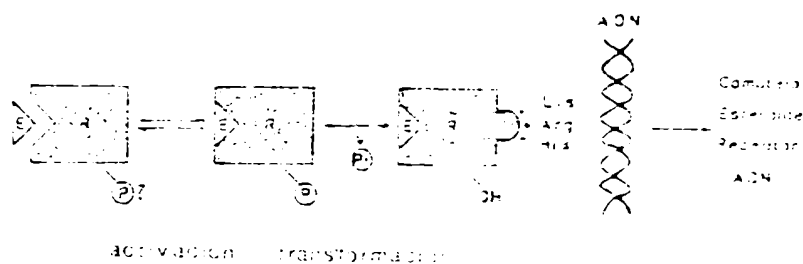
III. ESTUDIO DE LA TRANSFORMACION DE LOS SITIOS DE UNION PARA GLUCOCORTICOIDES DE LA MEDULA ESPINAL

INTRODUCCION

Los primeros estudios bioquímicos de los sitios de unión de GC en la ME se basaron en sus propiedades estáticas y su distribución [97,134,11], pero los procesos que pueden ocurrir luego de la interacción inicial entre el sitio de unión y el ligando no fueron analizados.

Un paso crucial en el mecanismo de acción de los GC en sus células efectoras es el de la transformación (figura III-1) del complejo hormona-receptor en el citoplasma. Este proceso involucra un cambio conformacional del complejo facilitando su unión a sitios nucleares. La transformación ocurre "in vivo" en condiciones fisiológicas [12] y puede ser facilitada o inhibida "in vitro" mediante manipulaciones físico-químicas [24] como son cambios en la temperatura, fuerza iónica, dilución, presencia de inhibidores como el molibdato, etc. [13, 23,135-137]. Los resultados obtenidos con marcadores químicos específicos sugieren que en la transformación se exponen los grupos funcionales de aminoácidos básicos como lisina, arginina e histidina [138-140]. Este cambio resulta en un aumento de la actividad de los complejos por los nucleosomas.

La transformación puede ser estudiada para su cuantificación [24]. La separación de complejos transformados se realiza midiendo su unión a nucleosomas purificados o ADN-celulosa y su separación de los no transformados por cromatografía de intercambio iónico.



Activación y transformación

El receptor (R) es una molécula fosforilable y al ser fosforilada para unir al esteroide (Eactivación). Al transformarse el complejo se desfosforila, cambia de conformación y aparece en su superficie cargas positivas por la aparición de aminoácidos básicos (Asp, Arg, His). Este cambio en la carga del receptor promueve su unión a ADN y polimerización. Modificado de De W. y Litwack G., en Biochemical Activation of Hormones. Litwack G., Academic Press N. York, p. 137-137n

en columnas de dietilaminoetano (DEAE)-celulosa o DEAE Sepha-
dex [136,141-144].

En la presente investigación se estudió la transforma-
ción de los ejos citosólicos 'in vitro', utilizando núcleos
purificados, ADN-celulosa, DEAE-celulosa y un procedimiento
de fracciones combinadas. Se combinaron
los ME con el HC y se estudió el efecto del molibdato
sobre su transformación en la ME.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y DISECCION DEL SN

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 150-250 g de peso, mantenidos, tratados y sacrificados como ya se describió en II. El SN fue extraído separando la ME y el HC de acuerdo al procedimiento de rutina del laboratorio [134,II].

MARCACION DE LOS SITIOS DE UNION CITOSOLICOS CON (³H)-DEX

El tejido nervioso se homogenizó en alguno de los siguientes "buffer" : TEMG (Tris 10 mM, EDTA 1,5 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y glicerol 10% (v/v), pH 7,4), TEMG+Mo (TEMG, molibdato de sodio 20 mM) o TEMG-Mo (TEMG, cloruro de potasio 30 mM para igualar la conductividad a la del TEMG+Mo[11]). Luego de centrifugar a 105 000 g durante 60 min se obtuvo un citosol que contenía 2-5 mg de proteínas por ml, según el método de Lowry y col. [117] utilizando albúmina de suero bovino para la calibración. Todos los procedimientos fueron realizados en frío e inmediatamente después de haber extraído los tejidos. El citosol se incubó con (³H)-DEX (14.1 Ci/mmol, New England Nuclear) 20 nM durante 20-22 h a 0 °C [134,II]. El inespecífico determinado en presencia de DEX 1 000 veces en exceso, fue del 10-20% de la unión total.

Para estudiar la transformación se realizó una incubación

posterior a 20 °C en incubador metabólico Dubnoff por el tiempo que se requiera en cada caso. Para separar el extracto fibroso el material se suspendió en 10 ml de agua destilada. La suspensión final: 2%, extracto 0.2% en agua destilada. Después de 10 ml de agua destilada luego se centrifugó.

con

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

Se siguió el método descrito por Sakaguchi y Tachibana [143] y Hutchins [144], todo el procedimiento se realizó a 4 °C. Se utilizó DEAE-celulosa Whatman DE-62 pre-hidratado con 10 volúmenes de HCl 0.5 N y se lavó con agua destilada. El preclorado se lavó con HCl 0.5 N y se lavó con agua destilada hasta neutralidad. Se equilibró con 10 volúmenes de homogenización en Erlenmeyer agitando suavemente con 10 volúmenes de agua destilada. Luego se dejó reposar 30 min. El extracto se aplicó a la columna hasta lograr un volumen de 10 ml. La conductividad fue monitoreada durante la elución. La elución se realizó a una columna de 1.9 cm de diámetro hasta completar un lecho con un volumen de 10 ml. El elutriado se realizó en la columna con el "Buffer".

Se sembraron 2 ml de citosol marcado con (^3H)-CEK, se dejó 10 min con 20 ml de "buffer", utilizando una bomba peristáltica LKB-Varioprecex 12 000, con un flujo ml/h. Luego de este lavado el nivel de radioactividad era el basal (100 cpm aproximadamente). Posteriormente se eluyó con un gradiente de fosfato 0-0,4 M de 50 ml obtenido con el sistema Buchler Universal colocando en las cámaras correspondientes 25 ml del "buffer" y 25 ml de KH_2PO_4 0,4 M en el "buffer" (ajustado al mismo pH). Se recogieron fracciones de 1 ml con la ayuda de un colector de fracciones LKB 2112 Redinac. De las fracciones recogidas se tomaron alícuotas de 10 μl para la determinación de fosfato inorgánico y en el resto se determinó la radioactividad por centelleo líquido. Los gradientes generados por este procedimiento fueron lineales en el rango 0-0,4 M de fosfato.

DETERMINACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO

Se utilizó el método de Lowry y Lopez modificado. Las alícuotas de μl de las fracciones fueron diluidas a 4 ml de De esta solución se tomaron alícuotas de 0,2 un volumen de 2 ml con agua. Se agregaba ml reactivo que consistía en 3 volúmenes de ácido ascórbico 1 g/30 ml H_2O y 2 volúmenes de molibdato de amon 0,6% (p/v) en H_2SO_4 6 N. Se incubó a 60 $^{\circ}\text{C}$. 10 min, se dejó enfriar y se determinó la absorbancia a 700 nm. La curva de ca-

libración se realizó tomando alícuotas de una dilución 1:400 del "buffer" con fosfato 0,4 M.

ENSAYO DE UNIÓN A ADN-CELULOSA

De acuerdo al método descrito por Kovacs y col. [146], se suspendió ADN-celulosa (ADN nativo de timo de ternera, P-L Biochemical) en "buffer" TEMG-10 (TEMG con albúmina de suero bovino 200 µg/ml y NaCl 10 mM) y se llenaron minicolumnas hasta un volumen de 0,4 ml. Se lavó repetidas veces con el "buffer" para equilibrar el lecho. En una cámara a 4 °C se sembraron 200 µl de citosol premarcado con (³H)-DEX y tratado con carbón-dextrán. se esperaron 10 min y se eluyó la fracción no unida a ADN con 4 lavados de 1 ml de TEMG-10, recogiendo las fracciones en viales. La radioactividad del último vial fue menor de 100 cpm (nivel basal). La fracción unida a ADN se eluyó con 2 lavados de 1 ml de TEMG-300 (TEMG-10 con NaCl 300mM). La radioactividad del eluido se contó luego de agregar a los viales 10 ml de tolueno centelleante (4 g de Omnifluor, New England Nuclear, por ml de tolueno).

PREPARACIÓN DE FRACCIÓN NUCLEAR PURIFICADA

Para obtener una fracción nuclear altamente purificada se procedió según McEwen y Zigmond [147]. Trozos de tejido de 100 mg fueron homogenizados en 3 ml de NI (sacarosa 0,32 M, KH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 6,5, Tritón X-100 0,25% v/v) con

homogenizador teflón-vidrio. El homogenato se centrifugó a 350 g durante 10 min. El precipitado se lavó 2 veces resuspendiéndolo en 3 ml de NII (NI sin el Tritón X-100) y volviendo a centrifugar y descartar el sobrenadante. El precipitado formado se resuspendió en 0,4 ml de NII y 2,1 ml de NIII (sacarosa 2,39 M, KH_2SO_4 1 mM, MgCl_2 3 mM, pH 6,6), se mezcló agitando con vórtex y se centrifugó a 15 000 g durante 45 min. El precipitado, que contenía la fracción nuclear purificada, se resuspendió en TEMG para la incubación con los complejos citosólicos marcados con (^3H)-DEX.

UNION DE COMPLEJOS CITOSOLICOS A LA FRACCION NUCLEAR

Se utilizó citosol marcado con (^3H)-DEX y luego tratado con carbón-dextrán. Una mitad se incubó a 45 °C durante 20 min para inactivar el complejo hormona-receptor [134,II]. Se mezclaron 0,5 ml de citosol inactivado o sin el tratamiento térmico con alícuotas de la fracción nuclear que contenían 10-30 µg de ADN, se agitaron y se incubaron por distintos tiempos a 20 °C en incubador metabólico Dubnoff. Al finalizar la incubación se agregaron 3 ml de TEMG frío, se agitó y se centrifugó a 1000 g, 15 min eliminando luego el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados sucesivos con 3 ml de TEMG cada uno y se extrajo la radioactividad asociada al precipitado 2 veces con 1 ml de etanol absoluto. Los extractos se recogieron en viales de vidrio y se evaporaron en estufa a 60 °C. La radioactividad

se determinó luego de agregar 10 ml de tolueno centelleante.

METODO RAPIDO DE CROMATOGRAFIAS COMBINADAS EN MINICOLUMNAS

Este método de Holbrook y col. [12] utiliza las propiedades de unión de los distintos complejos citosólicos para separar rápidamente los complejos transformados, no transformados y otros complejos, principalmente mero-receptores. El sistema está compuesto por tres minicolumnas armadas con jeringas de 1 ml conectadas en serie (figura III-2). A la columna inferior se le agregaron 0,4 ml de suspensión 50% de hidroxipatita (HAP) en "buffer" Hepes 10 mM, pH 7,6 con molibdato de sodio 10 mM, se dejó drenar, se completó con el "buffer" y se conectó la minicolumna del medio evitando la presencia de burbujas de aire. A esta se le agregaron 0,4 ml de suspensión 50% de DEAE-celulosa en el "buffer" Hepes 10 mM, pH 7,6, se dejó drenar y se completó con "buffer" para conectar la columna superior. Esta se llenó con 0,4 ml de ADN-celulosa 50% en el "buffer" Hepes con molibdato. Se enfrió el sistema en el cuarto frío (4 °C), donde se realizaron las demás operaciones. Antes de utilizar las minicolumnas se lavaron con 2 ml del "buffer" TDM (Tris 10 mM, ditiotretolol 0,5 mM, molibdato 10 mM, pH 7,6), mediante una jeringa de 10 ml conectada en la parte superior. Se dejó drenar, se sacó la jeringa y se sembraron 0,1 ml del cito- a analizar en la columna superior. Se colocó la jeringa de 10 ml con igual volumen de TDM y se eluyó aplicando presión so-

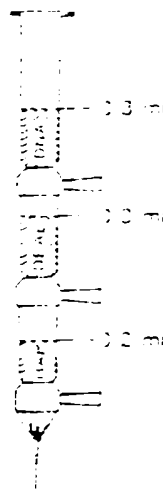


Figura 111-2 Columnas utilizadas para la los condemas clínicos que figan 10.

Se realiza con la jeringa de 1 ml conexas con la misma e interconectadas. La solución se realiza con 10 ml de "buffer" al 10% y la jeringa conectada en la de la succion. En el receptor se realiza de recoge el aspirado libre 10.

sobre el símbolo de la misma. Una vez finalizada
hizo pasar agua para eliminar el
desconectaron las columnas y se vació su
aplicando presión en sentido inverso. Se agregaron
líquido centelleante, se agitó y se determinó la radioactivi-

basar in citosol por este sistema, los complejos
transformados son retenidos por la ADN-celulosa de la minico-
lumna superior, los no transformados por la DEAE-celulosa de
la intermedia y los mono-receptores y demás complejos
de unen DEAE quedan retenidos en la HAP de la minico-
lumna inferior.

Este método tiene las siguientes ventajas sobre los mé-
todos cromatográficos convencionales: 1) velocidad, la sepa-
ración reduciendo el tiempo en el cual
ocurre la degradación o disociación de los
2) pueden analizar simultáneamente varias m permitien-
do estudios comparativos más rigurosos de
muestras muy pequeñas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se estudiaron por ANOVA y se uti-
lizó el test de Newman-Keuls para las comparaciones múltiples
y el test de Student para la comparación
de datos. Se utilizó una computadora Hewlett-Packard 16.

RESULTADOS

UNION DE COMPLEJOS CITOSOLICOS A LA FRACCION NUCLEAR

La figura III-3 muestra la unión a la fracción nuclear purificada de complejos citosólicos formados entre la (^3H)-DEX y sus sitios de unión. El citosol fue previamente incubado con (^3H)-DEX a 0 °C y tratado con carbón-dextrán. Luego fue separado en dos fracciones idénticas, una de ellas se incubó a 45 °C para liberar al esteroide de la unión a macromoléculas, la otra fue mantenida a 0 °C. En la fracción en la cual el corticoide estaba ligado a su sitio de unión se observó un aumento en la unión nuclear durante 1 h de incubación a 20 °C. En la otra fracción citosólica, que contenía la misma concentración de (^3H)-DEX y demás componentes del citosol, pero el esteroide no se encontraba unido a su sitio específico, la unión nuclear fue muy baja, similar al valor basal (tiempo = 0) de la fracción anterior y no varió con el tiempo.

ROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

La transformación de los sitios se estudió posteriormente por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Por este método los sitios transformados pueden separarse de los no transformados. La cromatografía se realizó con alícuotas de citosol de ME e HC previamente marcado con (^3H)-DEX. Los

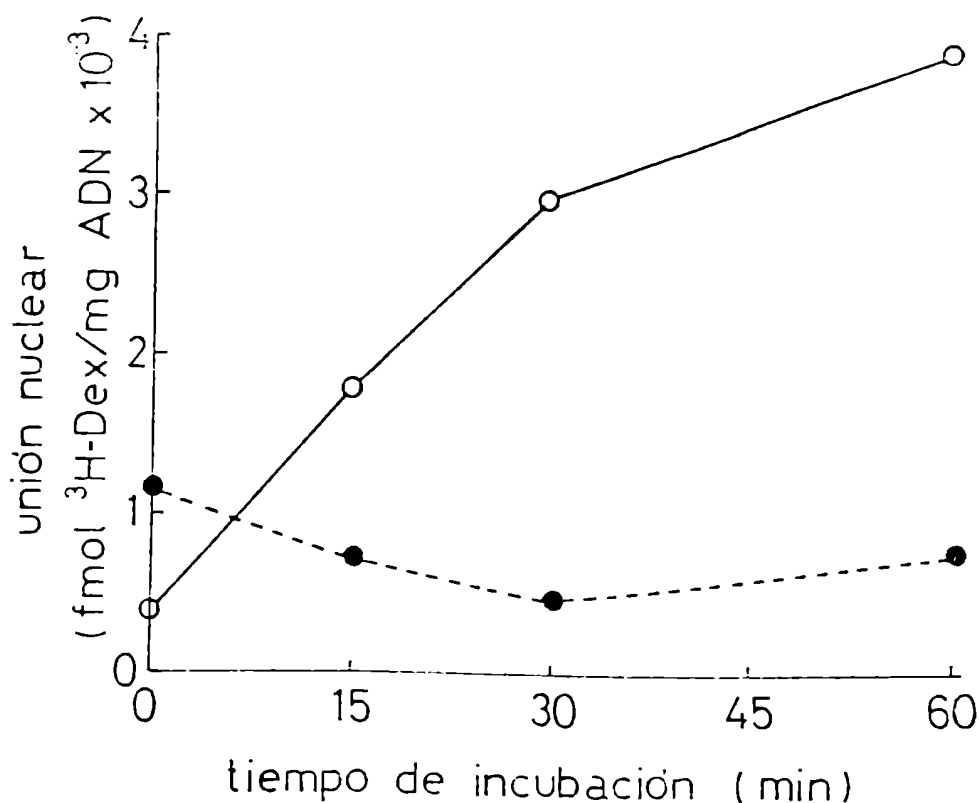


Figura III-3 : Unión de complejos citosólicos a la fracción nuclear.

Se incubó citosol con (³H)-DEX 20 nM a 0 °C durante 20 h y se lo trató con carbón-dextrán para eliminar la hormona libre. La mitad se incubó 20 min a 45 °C (---●---) para liberar al ligando de los complejos. La otra mitad se mantuvo a 0 °C (—○—). 0,5 ml de cada citosol se incubaron con la fracción nuclear purificada (ver materiales y métodos) a 20 °C por los tiempos indicados en la abscisa. Al finalizar la incubación se agregaron 3 ml de "buffer" y se descartó el sobrenadante luego de centrifugar a 5 000 g 15 min. Luego de realizar 3 lavados con 3 ml de "buffer" cada uno, se extrajo la radioactividad asociada a los precipitados con etanol absoluto y se la determinó por centelleo líquido.

citosoles fueron preparados en presencia de manganato, para lograr inhibición de la transformación [28] o en el mismo momento distintos tiempos a 20 °C para incrementar la misma. La figura III-4 muestra que si los citosoles de ambos tejidos eran incubados en TEMG-Mo a 0 °C y la (³H)-DEX retenida en la columna era eluida con el gradiente de fosfato de potasio 0-400 mM, aparecía un único pico a una concentración de 100 mM de la sal (gráficos A y E). A 0 °C pero incubando con TEMG-Mo, en ambos casos, apareció un segundo pico que se eluía con el frente del gradiente (gráficos B y F), pero no lo hacía en el lavado previo con "buffer". Este pico aumentó ligeramente si el citosol marcado era incubado durante 15-30 min a 20 °C (C,D,G y H). El pico más retardado se degradó considerablemente luego de 30 min de incubación (D y H). Este comportamiento es similar al descrito por otros autores que atribuyeron el pico I, que eluye a bajas concentraciones salinas, al receptor transformado y el pico II, que eluye a mayores concentraciones salinas, al receptor no transformado [143,144].

UNION 3. ADN-CELULOSA

La cinética de la transformación "in vitro" fue estudiada con minicolumnas de ADN-celulosa. La figura III-5 muestra los resultados obtenidos luego de incubar citosol preparado a 20 °C en presencia (gráfico inferior) o ausencia (grá-

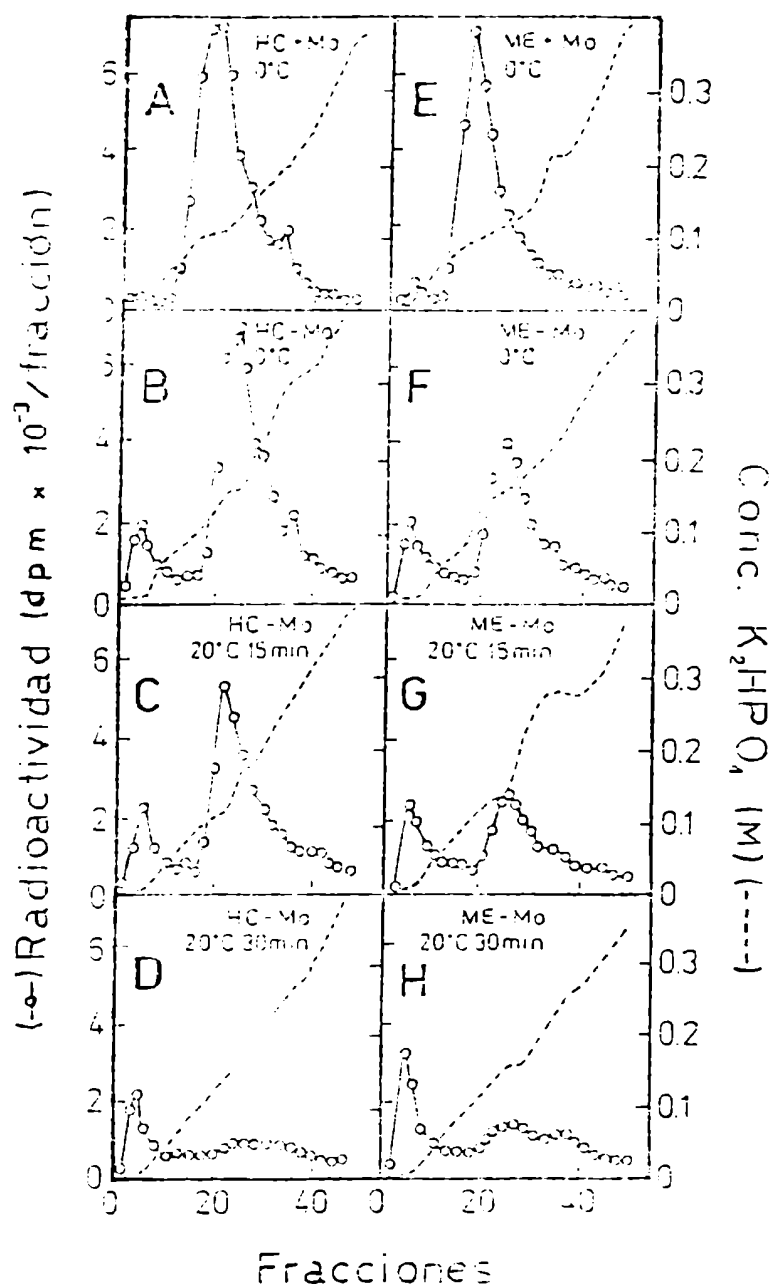


Figura III-F : Separación de complejos transformados y no transformados por cromatografía con DEAE-celulosa.

Los citosoles de ME (gráficos E-H) y de HC (gráficos A-D) fueron preparados en TEMG con molibdato (A y E) para obtener los complejos no transformados, o en TEMG sin molibdato (B-D y F-H). Se incubaron con (PH)-DEX a 0 °C, 22 h y luego 15 °C y G) o 30 min (D y H) a 20 °C, aquellos correspondientes a los gráficos A, B, E y F se mantuvieron a 0 °C. Luego se trataron con carbón-dextrán y se separaron en columnas de DEAE-celulosa. Se lavó con el "buffer" utilizado en la preparación del citosol y luego se eluyó con un gradiente lineal de fosfato de potasio 0-0,4 M. En las fracciones se determinó la radioactividad (—o—) y la concentración de fosfato inorgánico (---).

fico superior) de molibdato sódico. En su presencia todos los complejos fueron eluidos de la columna con el lavado inicial, y luego de 1 h prácticamente no se detectaron complejos transformados retenidos en la ADN-celulosa y que se eluyen con cloruro de sodio 300 mM. La incubación a 20 °C no afectó la estabilidad de los complejos ya que la unión se mantuvo constante en el transcurso de la incubación. En ausencia de molibdato, en cambio, los complejos retenidos en las columnas aumentaron alcanzando el valor máximo después de los 30-45 min de incubación. La unión total y los complejos no retenidos disminuyeron marcadamente, evidenciándose la degradación de los mismos. A la hora de incubación, la mitad de los complejos eran transformados, y se evidenció que estos, cuyos valores se mantuvieron invariables, poseían una mayor estabilidad que los no transformados.

La tabla III-1 detalla el efecto del molibdato sobre la dinámica de los complejos citosólicos de la ME. En ella se muestra la unión a ADN-celulosa de los complejos presentes en citosoles preparados con o sin molibdato incubados 45 min a 20 °C luego de las 3 h de incubación con (^3H)-DEX. En ausencia de molibdato la unión total disminuyó significativamente (de 93 a 51 fmol/ mg proteína), mientras que los complejos transformados aumentaron 10 veces (1,5 a 15 fmol/ mg proteína), siendo casi el 30% de la unión total. La diferencia en la unión total fue debida a la inactiva-

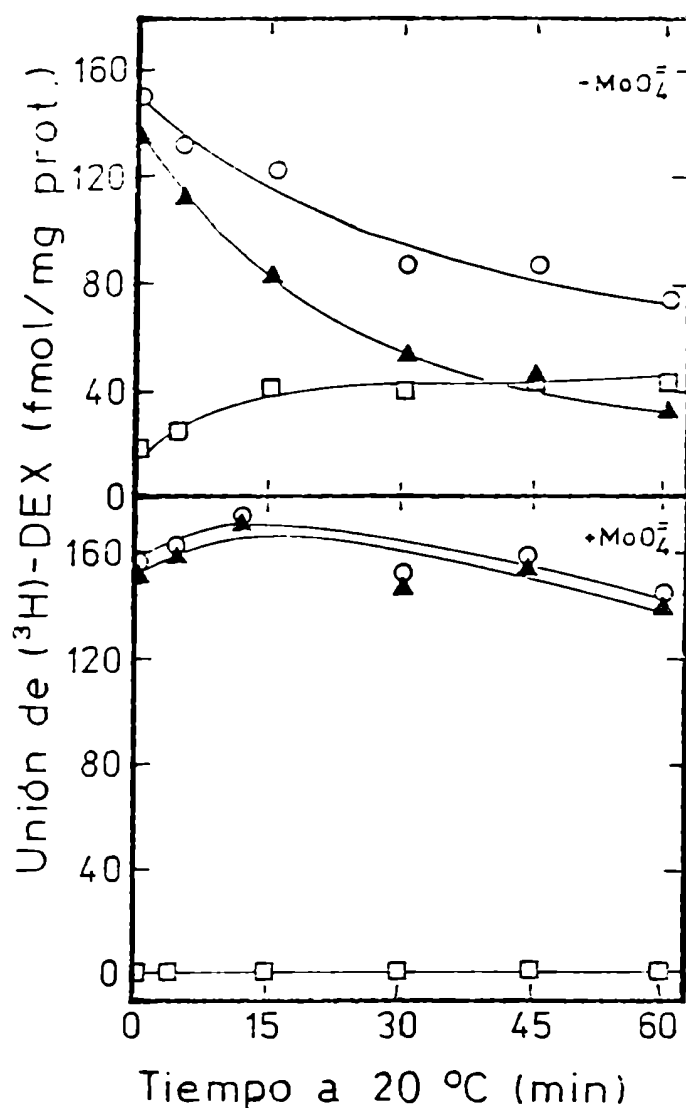


Figura III-5 : Determinación con ADN-celulosa de la cinética de transformación de los complejos citosólicos.

Los citosoles se obtuvieron en presencia de molibdato (gráfico inferior) o en su ausencia (gráfico superior) y se incubaron 20 h a 0-4 °C con (³H)-DEX 20 nM. Se incubaron durante los tiempos indicados a 20 °C y se trataron con carbón-dextrán. Se sembraron alícuotas en minicolumnas de ADN-celulosa y se eluyeron los complejos no transformados, que no se unen a ADN-celulosa, con TEMG-10 (NaCl 10 mM, —▲—), y los complejos transformados, unidos a la ADN-celulosa, con TEMG-300 (NaCl 300 mM, —□—), recogiendo los eluidos en viales. La unión total (—○—) se determinó sumando la de las dos fracciones.

Tic

no liberado

ADN-de' fibrosa

citoplasmicos
AG 2000

Buffer	n	Totales	No trans- formados	Trans- formados	% de trans- formación
TEMG-Mo		$\pm 4^*$	$35 \pm 2^*$	$15 \pm 2^*$	$29,3 \pm 1,3^*$
TEMG-Mo			91 ± 5	$1,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,5$

El citosol se obtuvo en presencia o ausencia de no-
liberato, luego se incubó con (3 H)-DEX a 0 °C se mantuvo
45 min a 20 °C y se trató con carbón-activo. Se separó
en minicolumnas ADN-celulosa y se eluyeron comple-
jos no transformados con TEMG-10 y los transformados con
TEMG-300. Los resultados se expresan como medias \pm ES, n
es el número de estudios.

* < TEMG-Mo (test de "t" no apareado).

ción de los complejos no retenidos por la ADN-celulosa que disminuyeron de 31 a 35 fmol/mg proteína.

En la III-2 se compara la unión a ADN-celulosa de los complejos citosólicos de la ME con los del HC, un efector GC clásico. Las incubaciones fueron realizadas en las condiciones que favorecen la transformación (sin molibdato y 45 min a 20 °C). La unión total en la ME fue la mitad a la del HC, cifra que está de acuerdo con datos anteriores [134, II]. La unión a ADN-celulosa expresada en fmol/mg proteína fue similar en ambos tejidos, mientras que si se expresa respecto a la unión total fue significativamente mayor en la ME.

ANÁLISIS CROMATOGRAFICO EN MINICOLUMNAS COMBINADAS

Con el método rápido de minicolumnas combinadas de Holbrook y col. [12] se determinaron los complejos transformados (unidos a ADN-celulosa), los no transformados (unidos a DEAE-celulosa), y los mero-receptores u otros complejos (unidos a HAP) de citosol de ME e HC. La tabla III-3 muestra que en condiciones de transformación, en ambos tejidos el 25-30% se unió a ADN-celulosa, 53-65% a DEAE-celulosa, mientras que la unión a HAP fue 12-15%. Omitiendo el calentamiento y utilizando TEMGAMo estas proporciones varían drásticamente. En estas condiciones la mayoría de los complejos eran no transformados (80%), siendo la unión a ADN-celulosa muy baja (1,2-3,6%). La fracción unida a HAP no

Tabla 111-2: Transformación de los complejos citosólicos de ME e HC.

Tejido	n	Complejos citosólicos (fmol/mg prot.)		% de transformación
		Totales	Transformados	
ME	4	121 \pm 8*	20,5 \pm 1,6	17,0 \pm 0,7**
HC	4	229 \pm 17	26,4 \pm 2,9	11,6 \pm 1,0

El citosol y las incubaciones se realizaron en TEMG. Se incubó 20 h a 0 °C y luego 45 min a 20 °C en presencia de (³H)-DEX. Se trató con carbón-dextrán y se sembraron alícuotas de los citosoles en las minicolumnas de ADN-celulosa. Se eluyeron los complejos no transformados con TEMG-10 y los transformados con TEMG-300. La unión total corresponde a la suma de ambos. Los resultados se expresan como medias \pm ES, n es el número de animales estudiados.

*: $p < 0,005$ menor que HC; **: $p < 0,005$ mayor que HC (test de "t" no apareado).

Tabla III-2: Análisis de los complejos citosólicos de ME e HC con un procedimiento rápido de minicolumnas combinadas.

Minicolumna	(^3H) -DEX unida (fmol/mg prot.)			
	ME		HC	
	-Mo	+Mo	-Mo	+Mo
ADN-celulosa	5,3 \pm 1,4	0,7 \pm 0,4	12,9 \pm 5,2	3,3 \pm 2,2
DEAE-celulosa	11,0 \pm 3,4	46,1 \pm 4,6	35,6 \pm 18,3	84,9 \pm 21,6
HAP	3,2 \pm 1,2	11,1 \pm 3,6	6,9 \pm 4,0	16,7 \pm 8,9

Citosol de ME y de HC se incubó en TEMG sin molibdato (-Mo) durante 3 h a 0-4 °C y luego 30 min a 20 °C en presencia de (^3H) -DEX 20 nM (condiciones de transformación) o de manera análoga pero en presencia de molibdato 20 mM e incubando solamente en frío (+Mo, condiciones no transformantes). Luego del tratamiento con carbón- dextrán, se sembraron las alícuotas en la columna superior, que contenía ADN-celulosa, de al conjunto de tres conectadas en serie. La central contenía DEAE-celulosa y la inferior HAP. De acuerdo a Holbrook y col., [12] en las mismas se retienen los receptores transformados, los no transformados y los mero-receptores, respectivamente. Los resultados se expresan como medias \pm 10 de para la ME y 3 para el HC.

tuvo cambios significativos. En las incubaciones en TEMG-Mo la radioactividad asociada a las tres columnas fue mucho menor. Volvió nuevamente la inactivación de los sitios en ausencia del agente protector.

DISCUSION

Estos resultados demuestran que los sitios de unión citosólicos para GC de la ME, como los receptores clásicos, son capaces de transformarse variando sus propiedades para adquirir una mayor afinidad por los núcleos y la ADN-celulosa. La unión del corticoide a los núcleos se verificó al incubarlo a 20 °C y solamente si este estaba ligado a una macromolécula termolábil. El esteroide libre, luego de inactivar la unión por calentamiento, no fue capaz de asociarse a la fracción nuclear. Esto implica que la unión del esteroide a los sitios aceptores nucleares requiere la presencia de los complejos citosólicos intactos.

La presencia de molibdato en el medio de incubación, como ocurre en otros tejidos [28], inhibió marcadamente la transformación. Por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa (figura III-3) se evidenció el efecto por la ausencia del pico I de receptor transformado, mientras que en los demás ensayos con minicolumnas la unión a ADN-celulosa fue muy baja o no detectable (figura III-4, tablas III-1 y 3). En todos estos casos el molibdato estabilizó la unión durante las incubaciones a 20 °C. Este comportamiento coincide con los mecanismos de transformación e inactivación del receptor de GC en los que se postula la pérdida de un fosfato como paso indispensable, del cual el molibdato es un po-

tente inhibidor [23].

La comparación del comportamiento de los sitios de la ME con los receptores clásicos del HC, realizada por unión a columnas de ADN-celulosa o mediante la técnica combinada muestra que la dinámica es similar. De acuerdo a estos métodos la aparición de las diferentes especies citosólicas que ligan al corticoide como los receptores transformados, no transformados y mero-receptores es concordante. Dadas las similitudes tanto en sus propiedades estáticas [134] como dinámicas de los sitios de ambos tejidos, la diferencia encontrada en la tabla III-2 en la cual los receptores del HC se transforman en menor proporción que los de la ME puede explicarse en base a una diferencia en otros factores citosólicos endógenos que son capaces de regular la transformación [24,28], más que a una diferencia intrínseca de los receptores. El hecho que en la ME los sitios sean fácilmente transformables favorece la idea de considerar a estos como verdaderos receptores que siguen el mecanismo clásico de acción [13,24,135-137].

La capacidad de la ME de producir modificaciones en su bioquímica y su fisiología en respuesta a los cambios en los niveles de los sitios de unión encontrados en este tejido sugieren que estos serían los receptores que median muchos de estos cambios. Estos actuarían alterando la expresión genética de las células al asociarse a su aceptor

nuclear luego de haberse transformado. Es necesario, sin embargo, tener en cuenta mecanismos alternativos ya que existen fenómenos como respuestas muy rápidas a la hormona [44] o unión de la misma a sitios de membrana [45], que no están completamente justificados por este modelo. El estudio de la ocupación por la hormona endógena de los sitios de unión, su interacción con los núcleos "in vivo", ayudaría a comprender su verdadera relevancia fisiológica.

IV. ESTUDIOS "IN VIVO" DE LOS NIVELES DE
GLUCOCORTICOIDES EN LA MEDULA ESPINAL:
CAPTACION NUCLEAR DE CORTICOSTERONA

INTRODUCCION

La presencia de sitios que ligan GC en citosol ha quedado bien establecida [134,II,III]. Los sitios hallados tienen alta afinidad por la DEX, que es un GC sintético. Si bien la afinidad por el GC natural de la rata, la CORT, es menor, como ya fue descrito para los receptores en los tejidos efectores clásicos como el hígado, el timo y el cerebro [82,120,130], la K_d se encuentra en el rango fisiológico para su ocupación por la hormona endógena circulante en forma libre [5].

Los receptores de la ME son capaces de transformarse "in vitro" adquiriendo afinidad por ADN-celulosa [III] lo que sugiere un mecanismo de acción genómico común al efecto de los GC en otros tipos de tejido [9]. La interacción de los corticoides "in vivo" ha sido estudiada por autorradiografía de regiones seleccionadas de la ME [96,103,104] pero estas investigaciones no fueron enfocadas desde el punto de vista bioquímico.

La ocupación de estos sitios en condiciones fisiológicas depende de la disponibilidad de hormona en el tejido. La captación tisular de hormonas esteroides está afectada por diversos factores entre los que se incluyen la unión a proteínas plasmáticas, la especificidad y saturación de los sitios receptores. Estudios realizados en zonas del

cerebro demostraron que existen ciertas diferencias regionales en el contenido de CORT [143-150], pero la captación nuclear del esteroide es diferencial respecto de la captación tisular, mostrando que ninguna región tiene un mecanismo de retención de la hormona y que posiblemente la retención nuclear y la tisular son independientes entre sí [150]. El HC que es la zona donde existe mayor unión citosólica presenta también los niveles más elevados de captación nuclear [91], por lo que se lo utiliza con fines comparativos en este estudio.

Con el objeto de determinar si los niveles de CORT en la ME y el SNC fluctúan de acuerdo a la actividad adrenocortical y si existen diferencias regionales entre zonas de la ME o entre esta y otras zonas del SN, se midió por RIA la CORT tisular de animales intactos, intactos sometidos a estrés y ADX. Para determinar la captación de CORT se inyectó el esteroide, a ratas ADX y se determinó su captación nuclear, citosólica y tisular, comparando los valores obtenidos con los niveles séricos. Se determinó la incorporación nuclear de (^3H)-CORT inyectada "in vivo" en la ME y

HC. La ME mostró niveles de CORT similares a los de otras zonas del SNC, sensibles a las variaciones sistémicas y retención nuclear de la hormona. Esta última sin embargo mostró diferencias en la ME respecto al HC, cuyos receptores se comportan cualitativamente en forma análoga "in vitro".

La captación nuclear "in vivo" evidenció que los efectos de los GC en la ME son similares a los observados en el nervio óptico [66], y difieren de los encontrados en

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y DISECCION DEL SN

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 150-250 g de peso corporal.

El tratamiento con GC se realizó por inyección intraperitoneal del esteroide (Sigma) disuelto en 0,4 ml de etanol-NaCl 0,9% (40%). Las ratas sometidas a estrés fueron colocadas en un ambiente a 4 °C durante 8 h.

La disección del SN se realizó según se describió anteriormente [134,II], obteniendo el HC, corteza cerebral, hipotálamo y ME. Esta última se seccionó en 5 segmentos C₁-C₂, C₃-C₇, T₁-T₃, T₉-L₃ y L₄-L₅. Las secciones C₃-C₇ y T₉-L₃ contenían los engrosamientos cervical y lumbar respectivamente, y L₄-L₅ la cola de caballo y "filum terminale".

OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES

Para obtener una fracción nuclear altamente purificada se procedió según McEwen y Zigmond [147,II]. La fracción citosólica se obtuvo centrifugando el primer sobrenatante a 105 000 g durante 60 minutos.

CAPTACION NUCLEAR DE (³H)-CORT EN ME E HC

Se inyectaron por vía endovenosa (femoral) 50 µCi (211 ng) de (³H)-CORT (New England Nuclear) disuelta en 0,3 ml de

etanol-salina (30%) a ratas ADX anestesiadas con éter. Luego de 60 min los animales fueron decapitados y se purificaron los núcleos de la ME y el HC. Debido a la baja incorporación de la radioactividad a los núcleos de la médula (ver resultados) se ensayaron modificaciones a la técnica original. Se intentó matar al animal a tiempos menores (30 min) o mayores (180 min), utilizar un "buffer" de homogenización sin Tritón X-100 (ya que el detergente disgrega la membrana nuclear externa), o utilizar un colchón de sacarosa más diluido (1,3 en lugar de 2,2M). También se intentó utilizar una preparación nuclear cruda [152].

La radioactividad se extrajo dos veces de la fracción nuclear con 1 ml de etanol absoluto. Los extractos se evaporaron en viales y se contaron con 10 ml de tolueno centelleante. Los resultados se expresaron como fmol de esteroide tritiado por mg de ADN.

DETERMINACION DE CORT EN TEJIDOS Y FRACCIONES NUCLEARES POR RIA

La determinación de CORT en homogenatos, fracciones nucleares y citosoles de los tejidos estudiados se realizó por RIA según la técnica de Underwood y Williams [153]. Los homogenatos se prepararon con 50 mg de tejido en 1 ml de agua. Una alícuota de 1 ml de citosol y los homogenatos se extrajeron con 1 ml de éter de petróleo para eliminar lípi-

dos no polares y progesterona [154] y luego 2 veces con 1 ml de diclorometano para extraer la CORT. Los dos últimos extractos se juntaron y evaporaron bajo corriente de aire. El residuo resultante se resuspendió en "buffer" borato 0,05 M pH 8 con gelatina 0,5% y se disolvió la CORT calentando 5 min a 45

La CORT de la fracción nuclear se extrajo 2 veces con 1 ml de etanol absoluto o se resuspendió el precipitado nuclear en 1 ml de agua, se sonicó y se extrajo de igual manera que los homogenatos y los citosoles. En el precipitado restante se determinó ADN según Burton [118].

El RIA se realizó en la suspensión de "buffer" borato utilizando el antisuero de Gordon Williams generado contra 2-monosuccinato-CORT acoplado a albúmina sérica bovina. A una alícuota de 0,1 ml de muestra se la llevó a 0,4 ml con el "buffer" y se agregó 0,1 ml de una solución del antisuero 1:2 000 (dilución final 1:10 000) con 30 000 cpm de (^3H)-CORT (New England Nuclear, Ae 105,0 Ci/mmol) como trazador en el mismo "buffer". En la curva de calibración se utilizó un rango de CORT (Sigma) de 50-2 000 pg/tubo. Se agitó e incubó 10 h a 0-4 °C. La (^3H)-CORT libre se separó con carbón-dextrín. Luego de contar la radioactividad del sobrenadante de 1 000 g, 10 min se calcularon los resultados utilizando la transformación de Rouband y Lewald [155].

Para realizar estos se desarrolló un programa

de computación en idioma Basic para una computadora Hewlett-Packard 35 con los siguientes periféricos: impresora HP 32345B y grabador: discos flexibles HP 31301. El programa cuyo diagrama de flujo se muestra en la figura IV-1 y cuyo listado de instrucciones se detalla en el apéndice al final del capítulo tiene las siguientes características: la entrada de datos de la curva de calibración se realiza con los valores de la masa fría de cada tubo y cpm, grafica los datos en coordenadas de log masa y logit, posibilidad de corregir datos, impresión optativa de datos, parámetros de la curva de calibración y gráfico, cálculo de resultados multiplicados por constante normalizadora (por ej. factor de dilución), posibilidad de dividir cada resultado por una variable (por ej. mg de tejido), indica valores que no entran en la curva de calibración, posibilidad de corregir o agregar datos, promedio y saca errores de grupos consecutivos, etc. La figura IV-2 muestra la impresión de los datos calculados de una curva de calibración y el gráfico log masa vs. logit de una determinación tipo.

La reacción cruzada con otros esteroides era: CORT 1000 17.6, progesterona 6,3, ALDO 1.9, testosterona y DES (162). La sensibilidad era de 60 ng/tubo. Los valores de 10_{50} obtenidos rutinariamente fueron 0,25 ng/tubo.

Los resultados fueron estudiados según ANOVA y las comparaciones múltiples se realizaron con el test de Newman-

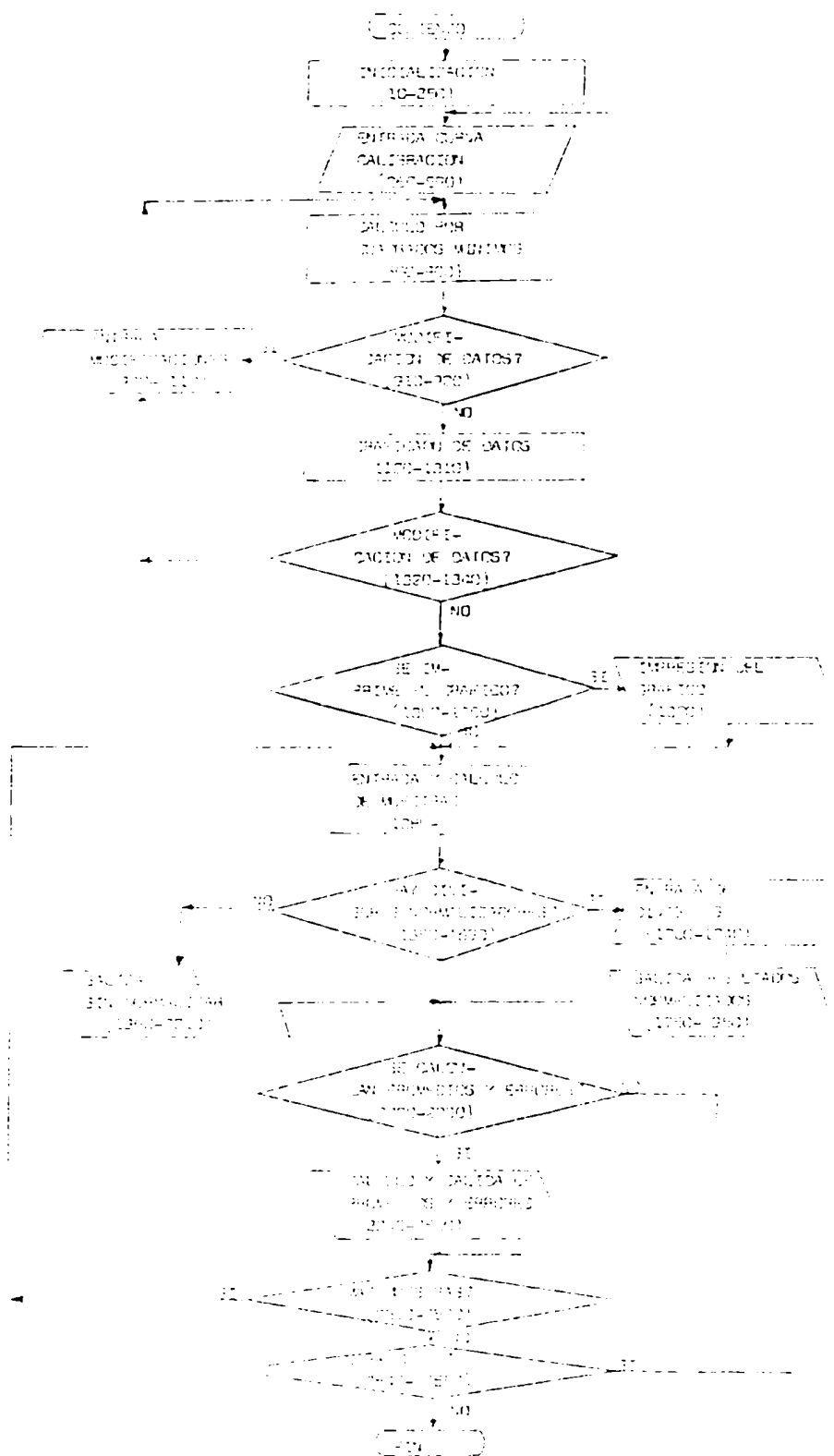


Figura IV-1 : Diagrama de Flujo del programa de computadora que realiza los cálculos para determinaciones basadas en curvas de desplazamiento utilizando la transformación logit-log. Los números entre paréntesis indican la numeración de las instrucciones involucradas en cada bloque (Ver apéndice IV-1).

RIA CONT EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: Análisis de datos y adrelectromiogramas
CURVA DE CALIBRACION

Y= 5.2737542714 - 0.011277739 X R2= .77517004305

M	CPM	MCPM	LOGIT
50	2509	2514.5	+1.70325
100	2540	2543.0	+1.62937
150	2541	2542.0	+1.35171
200	2597	2598.0	-1.04532
250	2558	2558.0	-1.36733
300	2192	2191.5	-1.25474
350	2191	2191.0	-1.17236
400	1340	1340.0	-2.10035
450	1713	1713.0	
500	1715	1715.0	
550	1718	1718.0	
600	1575	1575.0	
650	1535	1535.0	

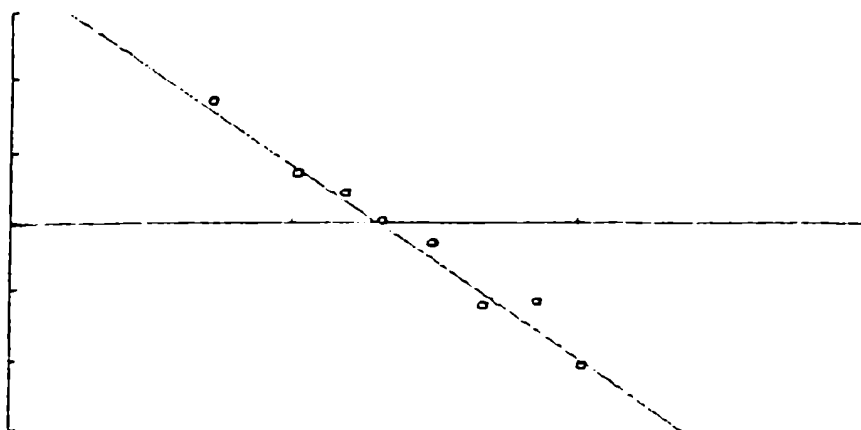


Figura IV-2 : Impresión de una curva de calibración según el programa de computación.

Se indica la ecuación de la recta obtenida por la transformación logit-log, con su coeficiente de correlación al cuadrado (R^2). M indica la masa fría agregada, CPM las cuentas por minuto contenidas, MCPM el promedio de las cuentas de los replicados. El gráfico indica los puntos obtenidos en un eje de coordenadas log (masa) vs. logit (unión).

Results.

DETERMINATION OF CORT SERICA POR RADIOCOMPETITION PROTEICA

a técnica de Murphy [196] uti-

o 1% en agua conteniendo gelatina

transcortina -CORT ligando.

El suero se llevaban a 4°C con a-

gua anticon a 100 °C durante 1,5 min para destruir

la transcortina endógena. Se agregó 1 ml de la solución de

¹²⁵I-CORT- transcortina (25 000 cpm) y se incubó 5 min a

30 min. Los tubos de la curva de calibración

CORT. La radioactividad libre se

la zona de fluoróforo, agita-

centrifugación a 1 000 g durante 10 min.

radioactividad

Los resultados

estando. Cada tubo de RIA en

RESULTADOS

DISTRIBUCION DE LA CORT. ENDOGENA

La distribución de la CORT en el SNC de ratas intactas y con ADX se muestra en la figura IV-3. El hipotálamo fue la zona con mayor contenido de CORT, con niveles significativamente por encima del HC, corteza cerebral y ME. La ME mostró valores algo superiores al HC y corteza pero sin alcanzar significación estadística. La ADX produjo una drástica reducción de la CORT en todas las zonas estudiadas, detectándose CORT en el hipotálamo y el HC pero no en la ME ni la corteza cerebral. Los valores de CORT sérica

ADX oscilaron en el límite de detección del ensayo (10 ng/ml), mientras que en los animales intactos fue superior a 200 ng/ml.

Distribución de CORT endógena en la ME fue estudiada en animales intactos y sometidos a estrés por frío (3 h a 4°C). En la figura IV-4 se observa que en los animales no estresados

los niveles se encuentran en la zona denominada entre las vértebras C_1-C_2 , cuya diferencia es

menor que la zona L_1-L_5 .

En la zona denominada "zona de dirección caudal", teniendo en cuenta la región C_2-L_1 una concentración considerablemente superior a las zonas (T_1-T_3 , T_3-L_3 y L_1-L_5). L_1-L_5 , que contiene los nervios de la cola de caballo y el "filum termi-

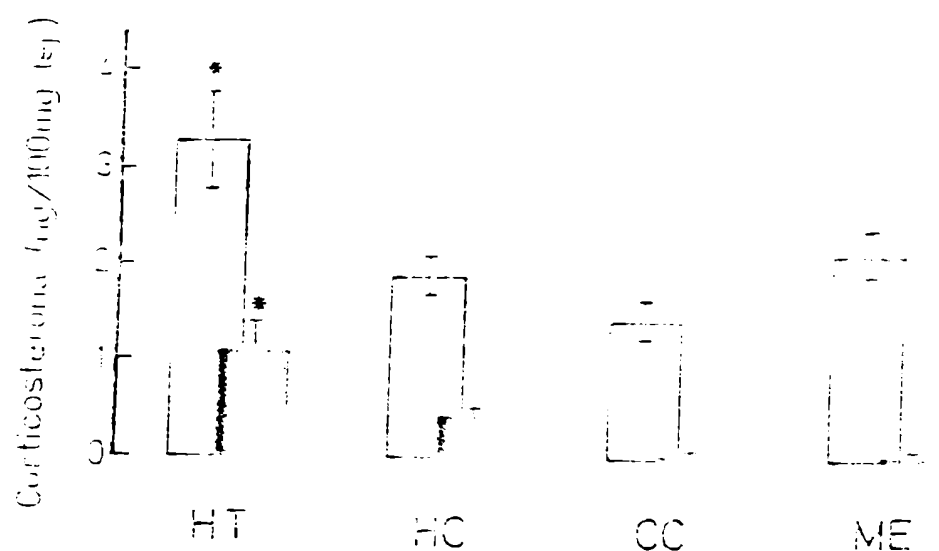


Figura IV-3. CORT en el SNC.

Se determinó por RIA en homogenatos de hipotálamo (HT), AC, corteza cerebral (CC) y ME de ratas intactas (□) y ADX (■). Cada barra representa la media ± SE de las determinaciones en las áreas de 5 animales. * indica la diferencia entre intactas y ADX. ** indica la diferencia entre HT y ME de 10.

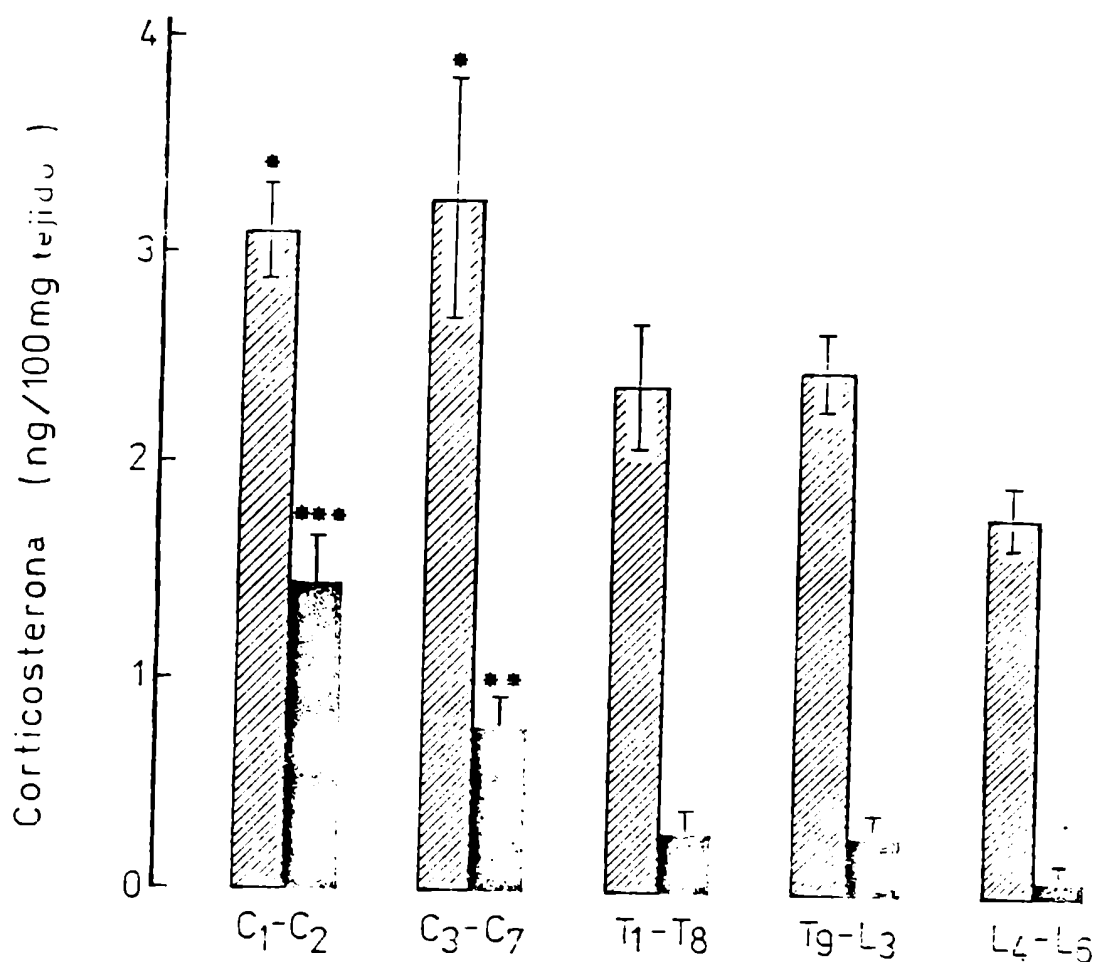


Figura IV-4 : CORT en la ME

En ratas intactas (■) y sometidas a estrés (▨) por frío a 4 °C durante 8 h se determinó CORT por RIA en las zonas de la ME comprendidas entre las vértebras : C1-C2, C3-C7, T1-T8, T9-L3, L4-L5. Se representan las medias + ES en todas las zonas la diferencia entre intactos y estresados fue significativa ($p < 0,01$, $n=5$)

* : $p < 0,05$ vs. L4-L6 estrés.

** : $p < 0,05$ vs. T1-T3, T9-L3 y L4-L5 intactos.

*** : $p < 0,05$ vs. C3-C7, T1-T3, T9-L3 y L4-L5 intactos.

nales, nivel de CORT más bajo. Los animales
valores de CORT significativamente
menor, siendo las diferencias
evidentes. El contenido de CORT de las
fue significativamente mayor que
Fig. 1; Esta última con tuvo nue-
vamente la normal.

INCORPORACION NUCLEAR DE CORT

Los niveles de CORT endógena encontrados
en la incorporación nuclear de 3H -CORT (dosis tra-
mostrada en la tabla). La incor-
poración total resultó, en 50%
Esta relación es similar a la de los
 3H -DEX (104,11.15) en 5% de
monogénico los nú-
cleos. Mientras que esta

inyección

la muestra

los

Tabla IV-1: Datos de ^{34}S -CORT en vivo y ME.

Fracción nuclear			
Región			
HC	1510 \pm 270*	72,8 \pm 10,6*	4,51
ME C ₁ -C ₂	714 \pm 192	3,9 \pm 0,9	0,55
ME C ₃ -C ₄	334 \pm 302	3,3 \pm 0,4	0,41
ME T ₁ -T ₃	375 \pm 258	3,0 \pm 0,7	0,31
ME T ₃ -T ₆	738 \pm 123	5,2 \pm 1,3	
ME		1,6 \pm	0,19

50 μM ^{34}S -CORT a ratas
 corruvo homogénito
 ear purificada significante procedimi

* <

después de una inyección
intraperitoneal

esteroides en forma de dis-
solución acuosa

que no afectó la hormona.

La concentración disminuyó permanentemente

2 h no se encontraron de

homogenato. El citosol no

la distribución del conte

que en el homogenato. La fracción

nuclear, en cambio, luego de 2 h mantiene valores inicia-

les, evidenciando que en estas condiciones se encuentran

de forma circulante.

En la figura IV-5 se observan los resultados obtenidos

pretratamiento con

CORT. Animales AOK fueron

4 mg/kg peso

100

117

100

La concentración de CORT se sumó

de

sin tratamiento al de 117 y 100

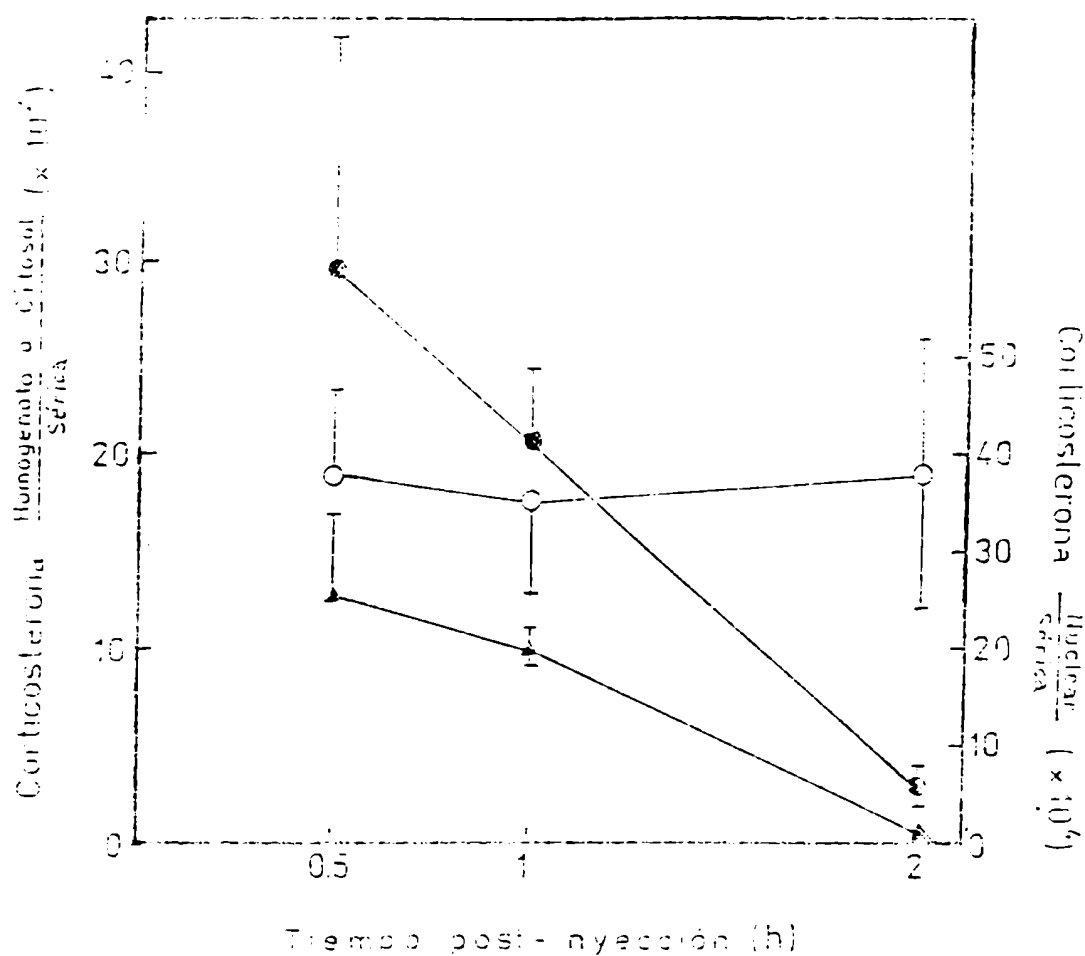
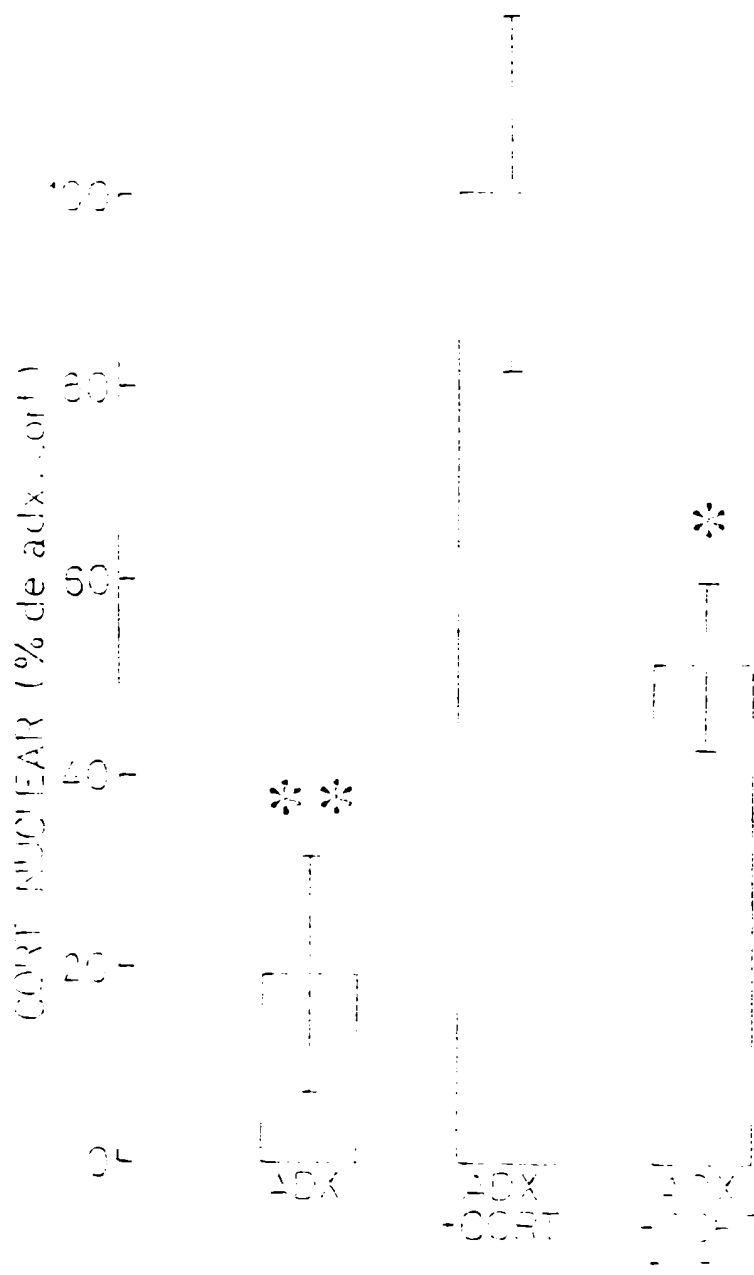


Figura 17-3: Captación de CORT en ME.

Se inyectaron 4 mg/kg peso de CORT i.p. a ratas 40X. a los tiempos indicados se sacrificó por vía intracardíaca con 10 ml de salina y se extrajeron los riñones. Se determinó la CORT sérica por radiocompetición directa y en las dos fracciones por RIA. La fracción nuclear y el citosol, obtenidos según se describe en materiales y métodos, se extrajeron con éter de petróleo y luego con ácido acético para obtener la CORT. En la figura se muestran las medias \pm SD de las relaciones con el control: \bullet — \bullet fracción nuclear, \circ — \circ y homogenato \blacktriangle — \blacktriangle .



1947-50 13
 1951-55 10
 1956-60 10
 1961-65 10
 1966-70 10
 1971-75 10
 1976-80 10
 1981-85 10
 1986-90 10
 1991-95 10
 1996-00 10
 2001-05 10
 2006-10 10
 2011-15 10
 2016-20 10
 2021-25 10
 2026-30 10
 2031-35 10
 2036-40 10
 2041-45 10
 2046-50 10
 2051-55 10
 2056-60 10
 2061-65 10
 2066-70 10
 2071-75 10
 2076-80 10
 2081-85 10
 2086-90 10
 2091-95 10
 2096-00 10
 2101-05 10
 2106-10 10
 2111-15 10
 2116-20 10
 2121-25 10
 2126-30 10
 2131-35 10
 2136-40 10
 2141-45 10
 2146-50 10
 2151-55 10
 2156-60 10
 2161-65 10
 2166-70 10
 2171-75 10
 2176-80 10
 2181-85 10
 2186-90 10
 2191-95 10
 2196-00 10
 2201-05 10
 2206-10 10
 2211-15 10
 2216-20 10
 2221-25 10
 2226-30 10
 2231-35 10
 2236-40 10
 2241-45 10
 2246-50 10
 2251-55 10
 2256-60 10
 2261-65 10
 2266-70 10
 2271-75 10
 2276-80 10
 2281-85 10
 2286-90 10
 2291-95 10
 2296-00 10
 2301-05 10
 2306-10 10
 2311-15 10
 2316-20 10
 2321-25 10
 2326-30 10
 2331-35 10
 2336-40 10
 2341-45 10
 2346-50 10
 2351-55 10
 2356-60 10
 2361-65 10
 2366-70 10
 2371-75 10
 2376-80 10
 2381-85 10
 2386-90 10
 2391-95 10
 2396-00 10
 2401-05 10
 2406-10 10
 2411-15 10
 2416-20 10
 2421-25 10
 2426-30 10
 2431-35 10
 2436-40 10
 2441-45 10
 2446-50 10
 2451-55 10
 2456-60 10
 2461-65 10
 2466-70 10
 2471-75 10
 2476-80 10
 2481-85 10
 2486-90 10
 2491-95 10
 2496-00 10
 2501-05 10
 2506-10 10
 2511-15 10
 2516-20 10
 2521-25 10
 2526-30 10
 2531-35 10
 2536-40 10
 2541-45 10
 2546-50 10
 2551-55 10
 2556-60 10
 2561-65 10
 2566-70 10
 2571-75 10
 2576-80 10
 2581-85 10
 2586-90 10
 2591-95 10
 2596-00 10
 2601-05 10
 2606-10 10
 2611-15 10
 2616-20 10
 2621-25 10
 2626-30 10
 2631-35 10
 2636-40 10
 2641-45 10
 2646-50 10
 2651-55 10
 2656-60 10
 2661-65 10
 2666-70 10
 2671-75 10
 2676-80 10
 2681-85 10
 2686-90 10
 2691-95 10
 2696-00 10
 2701-05 10
 2706-10 10
 2711-15 10
 2716-20 10
 2721-25 10
 2726-30 10
 2731-35 10
 2736-40 10
 2741-45 10
 2746-50 10
 2751-55 10
 2756-60 10
 2761-65 10
 2766-70 10
 2771-75 10
 2776-80 10
 2781-85 10
 2786-90 10
 2791-95 10
 2796-00 10
 2801-05 10
 2806-10 10
 2811-15 10
 2816-20 10
 2821-25 10
 2826-30 10
 2831-35 10
 2836-40 10
 2841-45 10
 2846-50 10
 2851-55 10
 2856-60 10
 2861-65 10
 2866-70 10
 2871-75 10
 2876-80 10
 2881-85 10
 2886-90 10
 2891-95 10
 2896-00 10
 2901-05 10
 2906-10 10
 2911-15 10
 2916-20 10
 2921-25 10
 2926-30 10
 2931-35 10
 2936-40 10
 2941-45 10
 2946-50 10
 2951-55 10
 2956-60 10
 2961-65 10
 2966-70 10
 2971-75 10
 2976-80 10
 2981-85 10
 2986-90 10
 2991-95 10
 2996-00 10
 3001-05 10
 3006-10 10
 3011-15 10
 3016-20 10
 3021-25 10
 3026-30 10
 3031-35 10
 3036-40 10
 3041-45 10
 3046-50 10
 3051-55 10
 3056-60 10
 3061-65 10
 3066-70 10
 3071-75 10
 3076-80 10
 3081-85 10
 3086-90 10
 3091-95 10
 3096-00 10
 3101-05 10
 3106-10 10
 3111-15 10
 3116-20 10
 3121-25 10
 3126-30 10
 3131-35 10
 3136-40 10
 3141-45 10
 3146-50 10
 3151-55 10
 3156-60 10
 3161-65 10
 3166-70 10
 3171-75 10
 3176-80 10
 3181-85 10
 3186-90 10
 3191-95 10
 3196-00 10
 3201-05 10
 3206-10 10
 3211-15 10
 3216-20 10
 3221-25 10
 3226-30 10
 3231-35 10
 3236-40 10
 3241-45 10
 3246-50 10
 3251-55 10
 3256-60 10
 3261-65 10
 3266-70 10
 3271-75 10
 3276-80 10
 3281-85 10
 3286-90 10
 3291-95 10
 3296-00 10
 3301-05 10
 3306-10 10

En el año de 1927 se le "E."
 en los extractos de la "E."
 separados con 1 mg/kg de la "E."
 a la vez se le "E."
 a la vez se le "E."
 a la vez se le "E."
 a la vez se le "E."
 a la vez se le "E."
 a la vez se le "E."

pequeña cantidad de sustancias reactivas con el anticuerpo del RIA en la fracción nuclear de animales ADX confirmando los resultados obtenidos en otras regiones del SNC. La CORT nuclear de los animales que solo recibieron esa hormona estaba significativamente aumentada (5 veces) respecto de los controles, mientras que el pretratamiento con DEX produjo una disminución de aproximadamente un 50% ($p < 0,05$) respecto de las que solo recibieron la hormona endógena. En estas condiciones la DEX compite con la CORT por los sitios de unión sin ser detectada en el RIA [152].

DISCUSSION

El nivel de CORT tisular hallado en la ME es semejante al del HC, que es un tejido que responde a los HC [89,91,111]. La distribución de la CORT endógena en animales en reposo o estresados muestra los niveles más elevados en las regiones cervicales y los más bajos en la zona lumbar (L_1-L_6). Esta distribución se asemeja a la distribución de los receptores citosólicos [134,11] en que la concentración en el engrosamiento cervical (C_3-C_7) fue una de las mayores y la de L_1-L_6 la menor. En el SNC los valores hallados están de acuerdo con datos anteriores [152], siendo el hipotálamo la zona que tiene el mayor contenido de CORT, a diferencia de la distribución de los sitios de unión citosólicos cuya máxima concentración se encuentra en el HC [84,105]. De las concentraciones tisulares puede inferirse la ocupación fisiológica de los sitios receptores, ya que estimadas en nM se obtienen valores en rango de 1-100 similar al de la K_d para la hormona endógena.

Las variaciones en el contenido tisular de CORT siguieron las variaciones del nivel sérico, relacionado directamente con la actividad de la corteza adrenal. La CORT aumentó en casos de estrés y prácticamente estuvo ausente en los animales AOX, demostrando que el tejido de la ME es

sensible a las fluctuaciones fisiológicas de la hormona endógena. Al igual que las otras zonas del SN [152] el contenido tisular de corticosteroides en la ME parece depender directamente de la concentración sérica.

De los resultados obtenidos de la determinación de CORT luego de inyectarla a animales ADX se infiere que la caída de los niveles en el homogenato entre las 0,5 y 2 h no implica que la hormona no pueda ejercer una acción efectiva sobre la fisiología o la bioquímica del tejido, pues en el HC, donde los GC son muy activos [89,111], se observa el mismo fenómeno. Se observó además que la CORT es retenida por la fracción nuclear de la médula, pudiendo desencadenar de esta forma una respuesta biológica. La baja proporción de hormona retenida en la fracción nuclear, aproximadamente 1% de la citosólica o del homogenato, explica que no pueda detectarse retención al considerar el contenido en el homogenato total.

La disminución de la captación nuclear de CORT por pretratamiento con DEX muestra que esta captación depende en gran medida de la presencia de otros GC. La inhibición de la captación nuclear de CORT puede atribuirse a un efecto competitivo entre los glucocorticoides por el sitio de unión responsable de la retención nuclear, si bien no puede descartarse un efecto metabólico más general de la DEX influenciando la captación y el transporte en la sangre de la CORT inyectada o bien un cambio del estado fisiológico de las células invo-

lucradas, como por ejemplo por regulación negativa de los sitios de unión como ha sido demostrado por nuestro laboratorio en el HC [95].

Si bien los sitios de unión citosólicos de la ME poseen las propiedades de los receptores de GC y se encuentran en una concentración de aproximadamente la mitad de los del HC, la incorporación nuclear de una dosis trazadora de (^3H)-CORT suministrada "in vivo" fue mucho menor. A esta observación se le puede atribuir diversas explicaciones. En primer lugar las bajas dosis de GC inyectadas a la circulación pueden no alcanzar la ME. Esta posibilidad podría descartarse teniendo en cuenta que el homogenato de la ME posee 50% de la radioactividad del correspondiente al HC. En segundo lugar la retención nuclear de radioactividad puede ser muy lábil en la ME disociándose de su unión durante la purificación de los núcleos liberándose a la fracción citosólica. Este mecanismo ha sido probado para las hormonas sexuales [158]. Si bien esta posibilidad merece tenerse en cuenta, la protección de los núcleos utilizando preparaciones más crudas [152] no aumentó la radioactividad nuclear. En tercer lugar, puede ser posible que una parte de los sitios citosólicos sea trasladada al núcleo, mientras que otra permanece en el citoplasma debido a la actividad de un inhibidor de la traslocación que actuó "in vivo" [159] o para realizar sus funciones en este compartimento celular. Esta población de receptores po-

ría ser similar a los receptores "cristalinos" del HC que no son traslocados luego de tratamiento hormonal "in vivo".

Estos resultados son similares a los encontrados por Meyer [65] en el nervio óptico, donde

en células que inducen la GPDH. que en la ME, en el nervio captación nuclear es baja en comparación al número de receptores citosólicos. Es posible, entonces, una localización glial de receptores en la ME. En el capítulo VI se aportan las evidencias de la inducción de GPDH en la ME.

La acción fisiológica de los GC en la ME es sugerida por los resultados de la determinación de CORT por RIA y por manipulaciones experimentales para aumentar o disminuir los niveles circulantes de CORT. También por la estabilización de la CORT nuclear respecto al suero posterior a una inyección de una dosis elevada del corticoides.

La CORT nuclear fue baja en animales AOX, aumentó por tratamiento con DEX y fue inhibida por tratamiento previo con DEX sugiriendo una competencia del DEX por el sitio nuclear.

La captación nuclear de CORT, variable de acuerdo a la dosis suministrada, junto con las evidencias de transformación de complejos citosólicos a un estado con afinidad por CORT y los núcleos [157,111] sugieren un

mecanismo de acción de los GC en la ME. Estos re-
los estudios autoradiográficos

localización

neuronal ME, con mayor, pero val. sea
ción nuclear de la citoplasmática.

APENDICE IV-1 : Listado de las instrucciones en idioma "BASIC" del programa de computadora diagramado en la figura IV-1. Los números a la derecha corresponden al número de la instrucción.

```

10 * VERSION 02 DE VIA FOR LOGIT LOG
20 DISP "CALCULO DE VIA FOR LOGIT LOG"
30 DISP "Impresion de resultados optativa"
40 DISP "Entrada de curva de calibracion con com y masa fria"
50 DISP "Grafico de recta log masa vs. logit con impresion optativa"
60 DISP "Correccion de puntos antes y despues de graficarlos"
70 DISP "Multiplicacion de resultados por constante normalizadora"
80 DISP "Elimina puntos fuera del rango de la curva"
90 DISP "Division de cada resultado por variable independiente (optativo)"
100 DISP "Posibilidad de promediar grupos de resultados consecutivos"
110 DISP "Posibilidad de agregar nuevos datos"
120 LOADIN "GNUM"
130 COM PROGRAM#(10)
140 PROGRAM#="R(A)"
150 DISP "Desca imprimir los resultados? 1=SI 2=NO" & INPUT JP
160 ON JP GOTO 170,220
170 PRINTER IS 201,30
180 DIM TITULO$(99)
190 DISP "Entra titulo y demas datos utiles (max. 80 caracteres = 1 renglon)"
200 INPUT TITULO$
210 PRINT TITULO$ & GOTO 270
220 PRINTER IS 1
230 GCLEAR
240 CLEAR
250 DIM X(25), Y(25), NS(5), N(25), CPM(25,5), MCPM(25)
260 PRINT "CURVA DE CALIBRACION"
270 DISP "CURVA DE CALIBRACION"
280 PRINT "*****"
290 DISP "*****"
300 DISP "Entra el numero de inespecificos (max. 5)"
310 INPUT NNS
320 DISP "Entrar com inespecificos de a una por vez"
330 NNS=0
340 FOR I=1 TO NNS
350 INPUT NS(I)
360 NNS=NNS+NS(I)/NNS
370 NEXT I
380 DISP "Entra el numero de Sceno (max. 5)"
390 INPUT NBO
400 DISP "Entrar com de Sceno de a una por vez"
410 NBO=0
420 FOR I=1 TO NBO
430 INPUT BO(I)
440 NBO=NBO+BO(I)/NBO
450 NEXT I
460 DISP "Entra numero de puntos de la curva (max. 25), y el numero de repeticio-
s"
470 DISP "Ej: 51, separados por una coma."
480 INPUT NUNREP
490 FOR I=1 TO 25
500 MCPM(I)=0
510 NEXT I
520 DISP "Entrada de los puntos:"
530 FOR I=1 TO N
540 DISP "Entra masa fria del punto: I & INPUT M(I)
550 FOR J=1 TO NREP
560 DISP "Entra com del repeticion: J: del punto: I & INPUT CPM(I,J)
570 MCPM(I)=MCPM(I)+CPM(I,J)/NREP
580 NEXT J
590 NEXT I
600 DEF FNLOG(X,A,B,C) = LOG ((A-C)/(B-C)/(1-(A-C)/(B-C)))
610 FOR I=1 TO N
620 X(I)=LOG M(I)
630 Y(I)=FNLOG(I/MCPM(I),MBO,NBO)
640 NEXT I
650 A=B,C,B,1,1,0
660 FOR I=1 TO N
670 R=A+X(I)
680 R=EXP(R)
690 R=EXP(R)-2
700 G=EXP(R)
710 R=EXP(R)+X(I)
720 NEXT I
730 R=(R-A+B)/(B-A-C/N) + PENDIENTE
740 G=(R-A+B)/(B-A-C/N) + COEF CORR CUAD

```

```

750 PRINT "Y=";D;"*(";P;"X)"      ";R2=";L
770 DISP "Y=";D;"*(";P;"X)"      ";R2=";L
780 IMAGE 54,1,87,AAA,9X,1A,3X,CA,7,5X,1,8X,2A,9X,4A,3X,5A
790 IMAGE 50,5X,50,5X,000000,0,5X,50,00000
800 IMAGE 11X,50
810 PRINT USING 790 : "M","MCM","MCM","LOGIT", "1","1111","1111","11111"
820 DISP USING 790 : "M";MCM;MCM;"LOGIT";"1";"1111";"11111"
830 FOR I=1 TO N
840 PRINT USING 790 : M(I),DEM(I),MCM(I),Y(I)
850 DISP USING 790 : M(I);MCM(I);MCM(I);Y(I)
860 FOR J=1 TO NREP
870 DISP USING 800 : CFM(I,J)
880 PRINT USING 800 : CFM(I,J)
890 NEXT J
900 NEXT I
910 DISP "Quieres cambiar algun dato ? SI=1 NO=2" ? INPUT Z
920 IF Z=2 THEN GOTO 1120
930 DISP "Quieres: AGREGAR=1 o SACAR=2" ? INPUT Z
940 IF Z=2 THEN GOTO 1030
950 N=N+1
960 DISP "Entra la masa fria" ? INPUT M(N)
970 MCM(N)=0
980 FOR J=1 TO NREP
990 DISP "Entra con del replicado:J" ? INPUT CFM(N,J)
1000 MCM(N)=MCM(N)+CFM(N,J)/NREP
1010 NEXT J
1020 GOTO 610
1030 N=N-1
1040 DISP "Entra el numero del punto que quieres sacar" ? INPUT W
1050 FOR I=W TO N
1060 FOR J=1 TO NREP
1070 CFM(I,J)=MCM(I)+1
1080 NEXT J
1090 MCM(I)=MCM(I)+1
1100 M(I)=M(I)+1
1110 Y(I)=Y(I)+1
1120 GOTO 550
1130 DISP "Para ver grafico oprime CONT"
1140 PAUSE
1140 DISP "Entra la maxima masa fria a graficar" ? INPUT H
1150 PRINT CLN; "H=";H
1160 DISP "Entra la minima masa fria a graficar" ? INPUT G
1170 PRINT CLN; "G=";G
1180 IF G=0 THEN G=1
1190 G=INT (LOG 10)
1200 XAXIS 0,1,6,H
1210 YAXIS 0A,1,1,7
1220 FOR I=1 TO N
1230 FOR J=1 TO NREP
1240 FOR K=1 TO H
1250 FOR L=1 TO G
1260 MOVE 0,0
1270 FOR K=1 TO H
1280 DRAW X,0+K*H
1290 NEXT K
1300 NEXT L
1310 NEXT J
1320 NEXT I
1330 DISP "Para continuar oprime CONT,para ver el grafico 8/3"
1340 PAUSE
1350 DISP "Modifica algun punto ? SI=1 NO=2"
1360 INPUT Z
1370 IF Z=1 THEN GOTO 1350
1380 DISP "Modifica el grafico ? SI=1, NO=2" ? INPUT ZRR
1390 ON ZRR GOTO 1370,1390
1400 DIM GRAF(100,10,10,10)
1410 PRINT USING 1400 : "ANALISIS DE LAS MUESTRAS","*****"
1420 PRINT USING 1400 : "MUESTRO DE LAS MUESTRAS","*****"
1430 PRINT CLN; "1111"
1440 DIM RES(200,2),AX(200),PC(200),pm(200,5),DIV(200)
1450 FOR I=1 TO 200
1460 AX(I),PC(I)=0
1470 DIM RES(I,5)
1480 DISP "Entra pm de"
1490 FOR I=1 TO 200
1500 DISP "pm de"
1510 PRINT CLN; "pm de"
1520 IF I=1 THEN PRINT CLN
1530 IF I=10 THEN PRINT CLN
1540 IF I=pm(1,5) THEN PRINT CLN
1550 NEXT I

```

```


1560 IF cpm(I,J) MMS THEN GOTO 1590
1570 A(I)=1 IF B(I)=1
1580 GOTO 1630
1570 RES(I,1)=10*(LNLOGIT(cpm(I,J),MBO,MMS)-Q)/P)
1600 RES(I,2)=RES(I,1)/A
1610 B(I)=B(I)+RES(I,1)/A
1620 A(I)=A(I)+RES(I,2)/A
1630 NEXT J
1640 NEXT I
1650 DISP "Quiero dividir cada resultado por un valor distinto ? (eq prot,etc)"
1660 DISP "SI=SI D=NO" IF INPUT ER
1670 DISP "Escriba las unidades del resultado final" IF INPUT UNIDADES
1680 PRINT "Unidades finales son: "UNIDADES
1690 IF RE=2 THEN GOTO 1760
1700 DISP "Escriba los divisores"
1710 FOR I=1 TO MU
1720 DISP "Para la muestra: "I
1730 INPUT DIVISION A(I):B(I):D(I)
1740 NEXT I
1750 PRINT USING 2160 : "Nro muestra",cpm,"Masa","Divisor","Resultado","*****
*****","*****","*****","*****"
1760 DISP USING 2160 : "Nro muestra",cpm,"Masa","Divisor","Resultado","*****
*****","*****","*****","*****"
1770 FOR I=1 TO MU
1780 IF A(I)=0 THEN GOTO 1870
1790 PRINT USING 2170 : I:cpm(I,1):D(I):"FUERA DE CURVA POR EXCESO"
1800 DISP USING 2170 : I:cpm(I,1):D(I):"FUERA DE CURVA POR EXCESO"
1810 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
1820 GOTO 1890
1870 IF A(I)=0 THEN GOTO 1870
1880 PRINT USING 2170 : I:cpm(I,J):B(I):D(I):A(I):"FUERA DE CURVA POR DEFECTO"
1890 DISP USING 2170 : I:cpm(I,J):B(I):D(I):A(I):"FUERA DE CURVA POR DEFECTO"
1900 GOTO 1890
1970 PRINT USING 2170 : I:cpm(I,1):B(I):D(I):A(I)
1980 DISP USING 2170 : I:cpm(I,1):B(I):D(I):A(I)
1990 IF RE=2 THEN GOTO 1940
2000 FOR J=2 TO RE
2010 PRINT USING 2180 : cpm(I,J)
2020 DISP USING 2180 : cpm(I,J)
2030 NEXT J
2040 NEXT I
2050 GOTO 2020
2060 PRINT USING 2170 : "Nro muestra",cpm,"Masa","Resultado","*****","*****
*****","*****"
2070 DISP USING 2170 : "Nro muestra",cpm,"Masa","Resultado","*****","*****
*****","*****"
2080 FOR I=1 TO MU
2090 IF A(I)=0 THEN GOTO 2040
2100 PRINT USING 2090 : I:cpm(I,1):"FUERA DE CURVA POR EXCESO"
2110 DISP USING 2090 : I:cpm(I,1):"FUERA DE CURVA POR EXCESO"
2120 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
2130 GOTO 2100
2140 IF A(I)=0 THEN GOTO 2090
2150 PRINT USING 2090 : I:cpm(I,1):B(I):A(I):"FUERA DE CURVA POR DEFECTO"
2160 DISP USING 2090 : I:cpm(I,1):B(I):A(I):"FUERA DE CURVA POR DEFECTO"
2170 GOTO 2100
2180 PRINT USING 2090 : I:cpm(I,1):B(I):A(I)
2190 DISP USING 2090 : I:cpm(I,1):B(I):A(I)
2200 IF RE=2 THEN GOTO 2150
2210 FOR J=2 TO RE
2220 PRINT USING 2190 : cpm(I,J)
2230 DISP USING 2190 : cpm(I,J)
2240 NEXT J
2250 NEXT I
2260 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
2270 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
2280 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
2290 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
2300 DISP "Quiero agrupar muestras para promediar resultados ? (SI=SI D=NO)"
2310 INPUT RE IF RE=2 THEN GOTO 2310
2320 DISP "Escriba el numero de grupos" IF INPUT NUMGRP
2330 FOR I=1 TO NUMGRP
2340 DISP USING 2340 : "Grupo: "I : "Entrar numero de primera y ultima muestra,
separados por coma" IF INPUT PRI,ULT
2350 IMAGE 4X,3D,5X,6D,15X,300D,00D,17X,25A
2360 DISP "Escriba el nombre del grupo (max. 32 caracteres)"
2370 INPUT GRUPO
2380 PRINT USING 2340 : "Grupo: "I : "NUMGRP:"(muestras: "PRI:" a "ULT:")"

```

```

0170 IMAGE SA,LO,CA,TVAL,TA,TD,CA,TD,IA
0200 DISP USING 1110 : "Promedio:" "INOMGRUP:" "Muestras ":"PRI:" "A ":"ULF:"")
0180 INPUT X SUBJ(1)
0190 IF X=0 THEN GOTO 0170
0210 PRINTX(X)
0260 IF COMED=0 THEN GOTO 0270
0270 RE-START
0280 READ IN PROMIO
0290 ENDGROUPX 1110
0300 IF NRES = 1 THEN GOTO 0450
0410 GOTO 0300 1110 : "Comedio:"PROM
0420 DISP USING 1410 : "Promedio:"FROM
0430 IMAGE TA,00000,0000
0440 GOTO 0500
0460 OS FOR (COUNX=NRES+FROM)/NRES-1)
0470 POSITIONX(NRES)
0470 PRINT USING 2480 : "Promedio:"FROM:"Desv.std.":"DS:"Err.std.":"ES
0480 IMAGE TA,00000,0000,X,100,00000,0000,S(X),TA,00000,0000
0490 DISP USING 2480 : "Promedio:"FROM:"Desv.std.":"DS:"Err.std.":"ES
0500 NEXT I
0510 DISP "¿As a usar la misma curva para otras muestras ? 1=YES 2=NO"
0520 INPUT CO
0530 IF CO#1 THEN GOTO 0610
0540 DISP "Empezamos nuevamente con otra curva ? 1=YES 2=NO" ? INPUT RE
0550 IF RE#1 THEN GOTO 170
0560 END

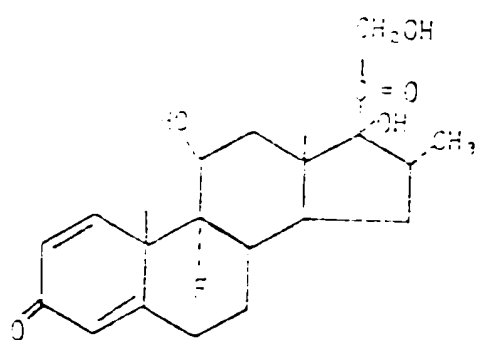
```

 ESTUDIO DE LA UNIÓN DE (^3H)-ALDOSTERONA EN LA
MEDULA ESPINAL: PRESENCIA DE SITIOS DE ALTA
AFINIDAD Y SELECTIVIDAD

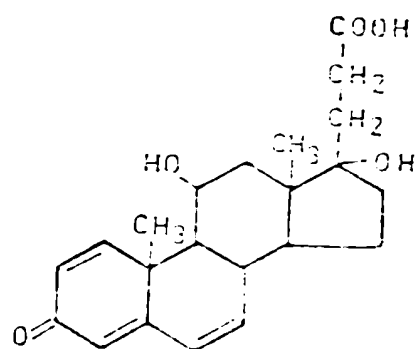
INTRODUCCION

El SN posee sitios de unión para MC. La ALDO se une en el cerebro a un sitio de unión específico para los MC aunque también puede ser unida por otro sitio con especificidad GC [79,82-85]. La distribución de los sitios de unión no es uniforme, localizándose principalmente en el HC y otras estructuras límbicas [81,84,85,104] y también en los órganos circunventriculares [160] .

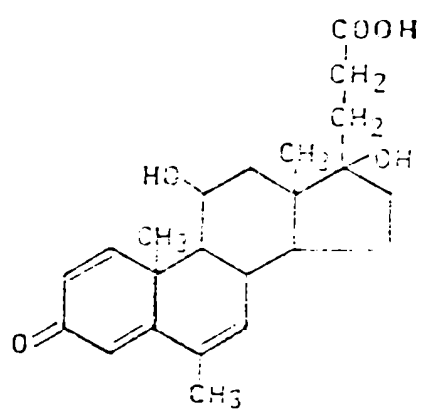
Para caracterizar las poblaciones de sitios de unión se han utilizado una serie de corticoides sintéticos (figura V-1) que tienen la ventaja sobre los naturales de no ser unidos por la transcortina, son más resistentes a la metabolización y son más específicos. Roussel Uclaf ha sintetizado una serie de esteroides de gran estereoselectividad para los sitios de unión de los receptores de hormonas esteroides. Para los GC se ha desarrollado el RU 26988 que interactúa exclusivamente con el receptor de GC y se lo ha utilizado para la cuantificación selectiva del receptor de MC co-incubándolo con (^3H)-ALDO. Este compuesto no tenía la desventaja de la inespecificidad de otros corticoides utilizados anteriormente como la DEX, TA, CORT y cortisol que pueden unirse con mayor o menor afinidad al receptor. Sin embargo se demostró que el RU 26988 no era estable en las condiciones experimentales y



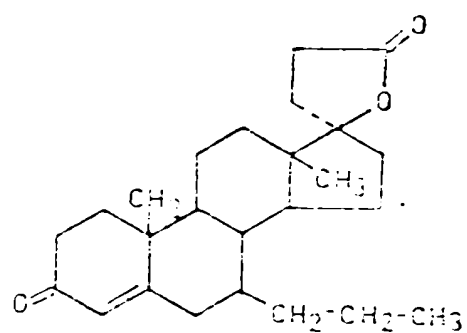
DEX



RU 26988



RU 28362



RU 21752

Figura

planas de corticoides sintéticos.

tenía una velocidad de disociación muy rápida. Adicionando un grupo metilo en la posición 6 se obtuvo RU 28362 (11 β -17 β -dihidroxi-6-metil-17 α -(1-propionil)-androstan-1,4,6-trien-3-ona), que no tiene estas desventajas y parece cumplir con todos los requisitos para el estudio de poblaciones complejas de sitios de unión [161]. Para los MC, se halló que 7 α -aiquilesteroides con sustituyentes cíclicos en el C-17 tenían actividad anti-MC dependiendo especialmente de la naturaleza del sustituyente aiquílico. Si los compuestos probados tenían en C-17 un hidroxilo y un grupo propiónico, eran capaces de unirse al receptor de MC si estos sustituyentes estaban en la forma lactona. Se encontró que la spinolactona RU 26762, sustituida con un propilo en C-7 (3-(3'-oxo-7 α -(propil)-17 β -hidroxi-androstan-4'-en-17 α il) propionolactona) tenía una alta afinidad por el sitio de MC y una menor afinidad por el de GC [163]. En la tabla V-1 se ilustran los valores de RBA de estos esteroides a diversos receptores de hormonas esteroideas. Estos compuestos permitieron comparar los sitios de GC de los de MC en el HC [162].

Los primeros estudios realizados en la ME con concentraciones moderadas de (^3H)-ALDO parecían indicar que esta hormona se unía exclusivamente a los sitios de GC debido a su baja afinidad y por el similar número de sitios. Los estudios autorradiográficos [104] y algunos estudios

Tabla V-1: Afinidad relativa de unión (RBA) de corticoides sintéticos por receptores citosólicos de hormonas esteroideas.

Receptor	RBA			
	DEX	RU 26988	RU 28362	RU 26752
GC	100	71	178	7,7
MC	24	< 0,1	< 0,1	173
Progestágenos	< 0,1	0,2	1	0,1
Andrógenos	< 0,1	0,1	0,1	1,6

Se incubaron durante 4 h a 0 °C citosoles de HC de ratas AOX (GC, RBA DEX=100) con (³H)-DEX, durante 24 h a 0 °C con (³H)-ALDO (MC, RBA ALDO=100), de útero de conejo inmaduro tratado con estradiol con (³H)-promegestona (R5020, progestágenos, RBA progesterona=100) y de próstata de rata castrada con (³H)-testosterona (andrógenos, RBA testosterona=100) [161-163].

bioquímicos [85] parecían indicar la presencia de sitios específicos para MC en la ME. Por ello, y contando con los bloqueantes específicos necesarios para identificar a los sitios de MC en presencia de receptores de GC, se inició este estudio para completar la caracterización de las poblaciones de sitios de unión de corticoides en la ME. Se demostró la presencia de por lo menos dos poblaciones de sitios de unión para la ALDO, el componente de alta afinidad evidenció selectividad para los MC y el de menor afinidad para los GC. Los sitios de alta afinidad se distribuyen casi uniformemente en toda la ME con concentraciones menores en la región caudal. En otros experimentos, hallamos que si se incubaba el citosol a mayor temperatura en presencia de sal, este era capaz de unirse a ADN-celulosa sugiriendo que puede tener una afinidad intrínseca por sitios nucleares relacionados con una acción genómica de la hormona.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas macho ADX Wistar de 200-250 g. Los animales se sacrificaron por decapitación, sin ser necesaria la perfusión ya que la ALDO no se une a las proteínas plasmáticas [133]. La ME fue utilizada entera o seccionada en regiones (C_1-C_2 , C_3-C_7 , T_1-T_3 , T_4-L_3 , L_1-L_5) como se indicó [134,II].

DETERMINACION DE SITIOS DE UNION CITOSOLICOS

Los tejidos se homogenizaron en "buffer" TEMG con maleato de sodio 20 mM, siguiéndose los procedimientos ya descritos [134,II] incubando con (3H)-ALDO (New England Nuclear, 30 Ci mmol) sola o en presencia de RU 23362 5 veces en exceso para bloquear su unión al receptor de GC y con (3H)-DEX. La unión inespecífica se determinó con agregato del esteroide fijo 1 000 veces en exceso y fue del 10-30% de la unión total, variando linealmente con la hormona tritiada agregada.

Los compuestos utilizados (RU 23362 y RU 26732) fueron obsequios del Dr. C. Philibert (Roussel-Uclaf, Francia).

Los resultados se expresan como fmol de esteroide tritiado unido por mg de ADN determinado por el método de la difenilamina [118] o por mg de proteína

TRANSFORMACION DE LOS SITIOS DE ALTA AFINIDAD POR (^3H)-ALDO

Para estudiar la transformación de la (^3H)-ALDO unida al sitio de alta afinidad se utilizó el método de las minicolumnas empleado para caracterizar el sitio de GC [12, 157, 11]. El citosol de la ME se incubó con (^3H)-ALDO 5 nM en presencia de GC 23362 50 nM en condiciones de transformación para un sistema libre de células similares a las de Munck y Holbrook [31], en "buffer" sin molibdato en presencia de KCl 150 mM durante 3 h a 0 °C y 0,5 h a 20 °C o incubado en condiciones no-transformantes en presencia de molibdato y 3,5 h a 0 °C. Luego se agregó igual volumen de una suspensión de carbón-dextrán (4-0,1%) en el "buffer" de elución [12, 157, 11] y luego de incubarlo 30 min a 0 °C se centrifugó a 5 000 g durante 10 min. Una alícuota del sobrenatante (0,3 ml) se sembró y eluyó del sistema de tres columnas consecutivas de ADN-celulosa, DEAE-celulosa y HAP, en las que se separan los receptores transformados, no transformados y nano-receptores respectivamente [12]. En estas condiciones el agregado de sal no modifica la unión a las diferentes fases cromatográficas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros de unión de los gráficos de Scatchard fueron estimados con el método de las pendientes límites de Rodbard y col. [164] para los sistemas de dos sitios y si-

guiendo el principio del gráfico lineal directo de Cressie y Keightley [165] para el modelo de un sitio de unión. Los cálculos se realizaron en una computadora Hewlett-Packard 30 A utilizando los programas disponibles en el IBVME desarrollados por el Dr. J. C. Calvo.

Las variaciones entre grupos experimentales en la distribución zonal y en los experimentos de competencia fueron estudiadas por ANOVA, realizando las comparaciones "a posteriori" con el test de Newman-Keuls [166].

Las comparaciones entre dos grupos independientes en el análisis por minicolumnas se realizaron por el test de "t" de Student.

Las ID_{50} y los RBA de las curvas de competencia se calcularon a partir de sus transformadas logit-log como se indicó [11].

RESULTADOS

ESTUDIOS CINÉTICOS Y DE SATURACIÓN

La figura V-2 muestra la curva de tiempo de incubación de citosol de ME con (^3H)-ALDO a 0 °C. El equilibrio se alcanza a las 4 h y se mantiene hasta las 22 h, aunque el medio de incubación no posea molibdato como agente protector adicional. Para asegurar un completo equilibrio y en vista de la escasa inactivación del receptor a 0 °C se toman 20 h como tiempo óptimo de incubación, al igual que las condiciones utilizadas en el HC para la determinación del receptor de MC [4].

En estas condiciones se realizaron los estudios de saturación con (^3H)-ALDO. En la figura V-3 se muestra la curva de saturación y el correspondiente gráfico de Scatchard de la unión en citosol utilizando concentraciones de (^3H)-ALDO de 5-25 nM. En estas condiciones se observa una unión que no se satura completamente, obteniéndose por extrapolación un número de sitios de 95 fmol/mg proteína y una K_d de 37 nM. La concentración de sitios es comparable a los 30-130 fmol/mg proteína obtenidos para la unión de GC (ver Resultados de II) y la afinidad es similar a la calculada a partir de la K_d de (^3H)-DEX (3,2 nM) y el RBA de ALDO respecto de DEX (7,1%) que es de 45 nM.

Sin embargo, en estudios recientes se observó que si

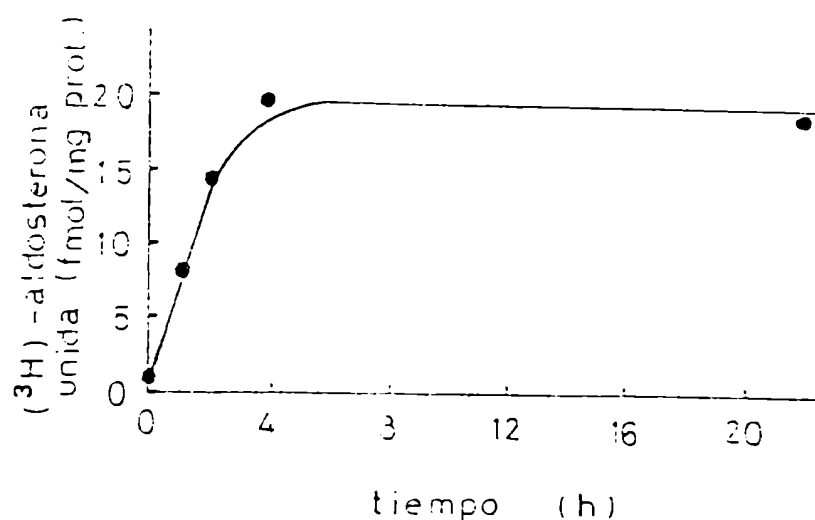


Figura 7-2 : Cinética de la unión de (³H)-ALDO en citosol de ME.

Se incubó el citosol de médula entera preparado en TEMG a 0 °C durante los tiempos indicados en presencia de (³H)-ALDO 4,1 nM, luego se separó la hormona libre por filtración en minicolumnas de Sephadex LH-20 y se contó la radioactividad en el eluido. El inespecífico se obtuvo incubando en presencia de ALDO 5 μM.

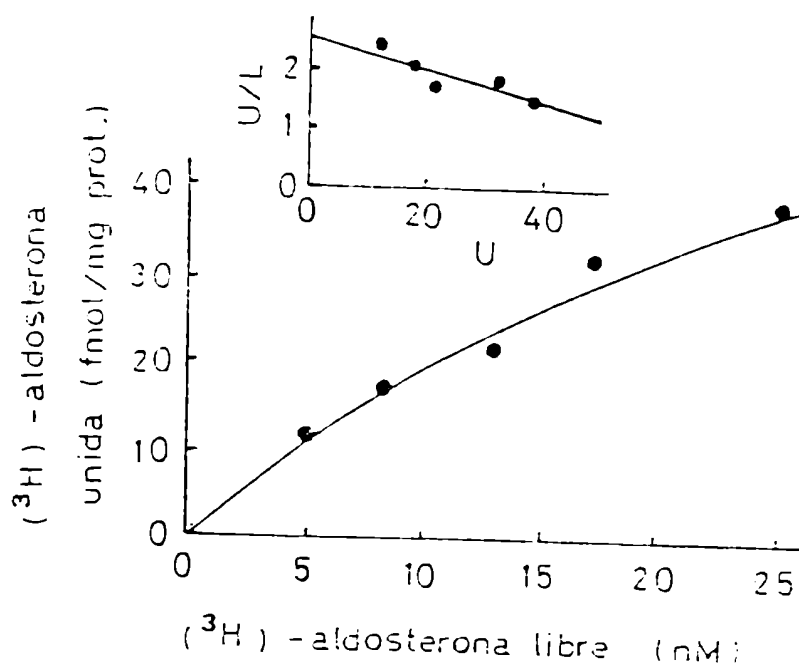


Figura 7-3 : Análisis de saturación de la unión de (^3H) -ALDO en altas concentraciones en citosol de ME.

El citosol fue incubado a 0°C durante 20 h en presencia de (^3H) -ALDO 5-25 nM. El gráfico muestra la curva de saturación y el apartado superior la representación de Scatchard. Los parámetros de unión estimados fueron N_{max} 35 fmol/mg proteína y K_d 37 nM.

se utiliza un rango de (^3H)-ALDO que incluya concentraciones menores (0,3-46 nM), aparece una curvatura en el gráfico de Scatchard que sugiere la presencia de otro sitio de unión de mayor afinidad por el ligando (figura V-4). Tomando un conjunto de tres experimentos similares se obtuvieron valores de K_d de 0,8 nM en promedio para el sitio I o de alta afinidad y de 30,8-195 nM para el sitio II o de baja afinidad (Tabla V-2). El número de sitios fue siempre mayor para el tipo II. Coirini y col. mostraron en citosol de HC que el RU 28362 en concentraciones 10 veces mayores no desplaza en forma significativa la unión de (^3H)-ALDO presente en concentración 5 nM, mientras que producía una inhibición casi máxima de la unión de GC. En presencia de RU 28632 en esta concentración para impedir la unión de (^3H)-ALDO al sitio de GC dejó de visualizarse el componente de baja afinidad, obteniéndose un gráfico de Scatchard rectilíneo, permaneciendo el sitio I inalterado.

ESTUDIOS DE COMPETENCIA

Los competidores utilizados, RU 28362 como anti-GC y RU 26752 como anti-MC, fueron ensayados para competir con la unión de (^3H)-DEX en citosol de ME. La figura V-5 muestra las curvas de competición de la unión de (^3H)-DEX 10 nM con concentraciones crecientes de RU 28362, DEX y RU 26752. La afinidad de RU 28362 por estos sitios de GC fue mayor que el

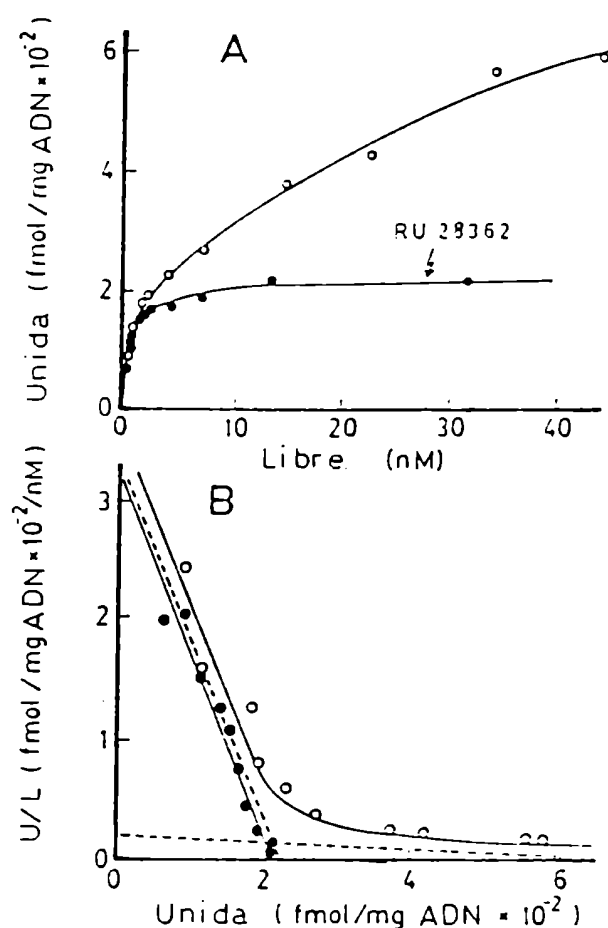


Figura V-4 : Análisis de saturación de la unión de (^3H) -ALDO en un amplio rango de concentraciones del ligando.

El citosol fue incubado a 0 °C durante 20 h en presencia de (^3H) -ALDO 0,3-46 nM, con incubaciones paralelas en presencia de un exceso de ALDO (1 000 x) para determinar unión inespecífica. A : curvas de saturación obtenidas en presencia (●—●) o ausencia (o—o) de RU 28362 (bloqueante de receptores de GC) en concentraciones 10 veces superiores a las de (^3H) -ALDO. B : gráfico de Scatchard de los datos de unión en presencia (●—●) o ausencia (o—o) de RU 28362. Las líneas punteadas representan las 2 componentes obtenidas de la curva del gráfico de Scatchard en la que no se agregó RU 28362, según el método de Rodbard [164] . Ver Resultados y tabla V-2.

Tabla V-2: Parámetros de unión de (^3H)-ALDO en citosol de ME.

Exp. N°		(^3H) -ALDO		(^3H) -ALDO + 10x
		Tipo I	Tipo II	RU 28362
I	Kd	0,97	42,3	1,06
	Nmax	178	534	232
II	Kd	0,76	195	0,52
	Nmax	315	5360	263
III	Kd	0,69	30,8	0,66
	Nmax	221	670	213

Las condiciones experimentales son las de la figura V-4. Kd se expresa en nM y el número de sitios (Nmax) en fmol/mg de ADN. Los sitios de tipo I y II se refieren a aquellos representados por las líneas punteadas en el gráfico de Scatchard de la figura V-4 (exp. N°III).

de la 286, mientras la de RU 26752 fue variable (31-33%).

Como se muestra en la figura 7-4, los estudios de competición fueron realizados utilizando concentraciones diferentes de ^3H -ALDO a concentraciones de 1 nM se une casi exclusivamente a los sitios de tipo I (ver figura 7-1), mientras que concentraciones de 10 nM permiten la ocupación de ambos sitios de unión. Estas concentraciones de ^3H -ALDO fueron competidas con concentraciones de RU 28362 (anti-40) o la solinactona 2, 26752 (anti-40). En la figura 7-5 se observa que la unión ^3H -ALDO 1 nM era significativamente desplazada por todas las concentraciones de RU 26752 utilizadas ($p < 0.01$), con un IC_{50} de 0.01 nM con este sitio. Por el contrario, RU 28362 fue totalmente ineficaz para desplazar la unión del ligando 1 nM. Para concentraciones de ALDO 10 nM, RU 26752 fue un buen inhibidor pero menos efectivo que ^3H -ALDO 1 nM. La inhibición de la unión fue significativa para concentraciones mayores a 10 nM, mientras que la unión de una concentración de 1 nM no alcanzó significación. RU 26752 mostró un valor IC_{50} de 10,5 nM. El anti-40, RU 28362, no varió la unión ^3H -ALDO 1 nM pero desplazó la unión del ligando 10 nM a partir de concentraciones ($p < 0.01$), en forma constante a un

valor del 55,5% en promedio de la unión en ausencia de compenión. Este comportamiento puede ser explicado por la unión de $(^3\text{H})\text{-ALDO}$ del receptor de GC pero no al sitio de MC, que con concentraciones del ligando se elevaba hasta en un 44% al de GC y en un 56% aproximado.

DISTRIBUCION REGIONAL

La distribución regional fue estudiada incubando frascos de las distintas secciones de ME con $(^3\text{H})\text{-ALDO}$ 5 nM para asegurar la completa saturación de los sitios de tipo I y presencia de RU 28361 50 nM para bloquear la unión del ligando a los sitios de tipo II. La figura 7-7 muestra que la zona comprendida entre las vértebras L1-L5 contenían un menor número de sitios ($p < 0,01$) que las otras regiones estudiadas. Se encontró una tendencia (no significativa) a valores mayores de unión en regiones tales como L3-L5 y T3-T5, que son las que contienen los endoneurios y axones respectivamente. Esta distribución es similar a la encontrada para los sitios de tipo I en la ME.

TRANSFORMACION DE LOS SITIOS TIPO I

La tabla 7-3 muestra los resultados obtenidos utilizando un método cromatográfico rápido que emplea tres co-

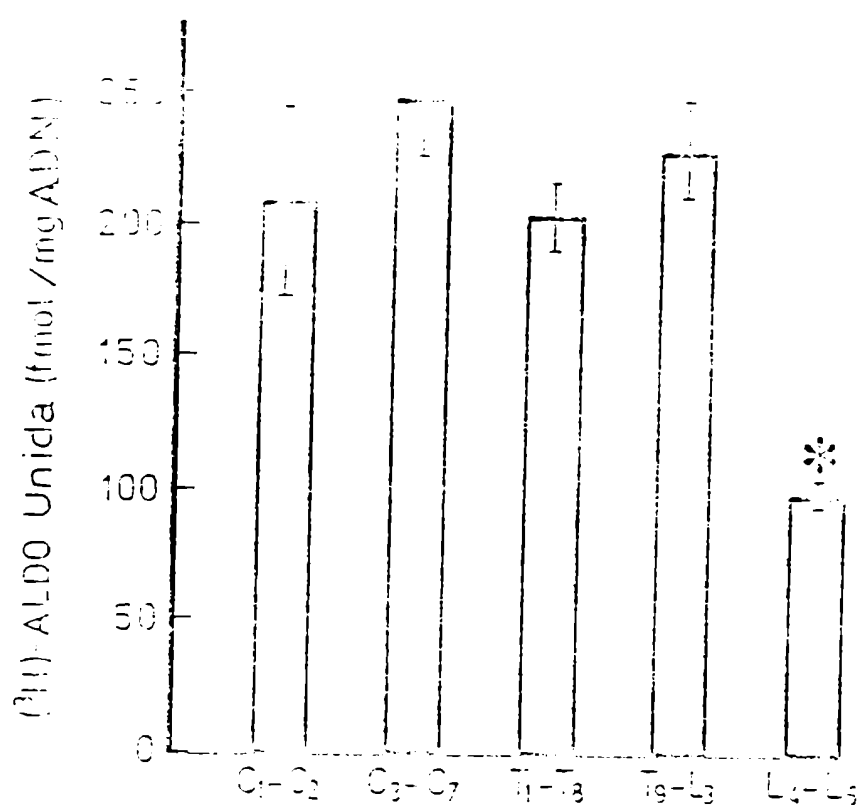


Figura 7-1 : Distribución de los sitios de unión de tipo I en regiones de la ME.

Se incubaron citosoles de las regiones comparativas entre las vértebras indicadas con ^3H -ALDO 5 nM y RB 29087 50 nM durante 20 h a 0 °C. Cada columna representa la media \pm ES de 6 determinaciones, cada una de ellas realizada de 2 ME juntas.

* $p < 0.01$ vs. todas las demás regiones.

Tabla 7-3: Análisis de los sitios de tipo I de citosol de ME por una técnica cromatográfica combinada.

Minicolumna	(^3H) -ALDO Unida (fmol/mg ADN)	
	Condiciones de transformación	Condiciones no transformantes
ADN-celulosa	89 \pm 20*	15 \pm 3
DEAE-celulosa	65 \pm 24	153 \pm 34
HAP	17 \pm 6	7 \pm 4

El citosol fue incubado con (^3H) -ALDO 5 nM y RU 29362 50 nM en TEMG con KCl 150 mM durante 3 h a 0 °C y 30 min a 20 °C (condiciones de transformación) o en TEMG con Na_2MoO_4 20 mM 3,5 h a 0 °C (condiciones no transformantes). Luego del tratamiento con carbón dextrán se sembraron en el sistema de minicolumnas y se eluyeron con Tris 10 mM, DTT 0,5 mM y Na_2MoO_4 10 mM [III]. Después de la elución se contó la radioactividad asociada a cada fase cromatográfica y se expresaron los resultados como medias \pm ES en fmol/mg ADN de 4 determinaciones independientes.

*: $p < 0,02$ vs. ADN-celulosa de condiciones no transformantes.

lumnas combinadas para la separación de receptores transformados que se retienen en la ADN-celulosa, receptores nativos, no transformados que quedan en la DEAE-celulosa y otros complejos que incluyen fragmentos de degradación proteolítica que poseen el sitio de unión del esteroide (mero-receptores) quedan retenidos en la HAP [12,31,157]. En condiciones no transformantes (sin calentamiento y en presencia de molibdato) la mayor parte de los complejos (37%) permanecen en la DEAE-celulosa y solamente una pequeña proporción se une a la ADN-celulosa (9%) y a la HAP (4%). Luego de calentar en presencia de KCl 150 mM y en ausencia de molibdato la mayoría de los complejos (52%) se unen a la ADN-celulosa (significativamente mayor a la unión en condiciones no transformantes) disminuyendo la unión a DEAE-celulosa (38%) y aumentando la unión a HAP (10%).

44

45

st 50

conclusions

179.31-

1a 1000000000

10

1207

1000000000

100

1000

y MC [32-35, 160, 161, 162, 163, 171]. La unión de 34 -ALD¹ fuertemente al sitio [162, 171], si bien es capaz de desplazar a [162, 171], al sitio de 10 con una afinidad muy baja. El anti-10 RU 23352, que no se une al MC [161, 162], es incapaz de competir por esta unión. Cuando se incubó con 34 -ALD¹ 10 nM para permitir una unión similar a ambos sitios, RU 23352 inhibió un 44% la unión, dejando unido al sitio de MC. El RU 26752 también desplazó la unión de 34 -ALD¹ 10 nM pero fueron necesarias concentraciones mucho mayores para desplazar el [162, 171] de la unión (ID_{50} = 20,6 nM cuando se utilizó 34 -ALD¹ 1 nM (ID_{50} = 0,31 nM)).

En el cerebro se han determinado [162, 171] la unión de 34 -ALD¹ al [162, 171]. En estos estudios se ha observado la presencia de una única población de sitios de unión. En general, los resultados obtenidos en el cerebro de ratón y de hombre son similares. La 34 -ALD¹ se une al [162, 171] con una afinidad similar o mayor [35, 162, 163, 172]. "In vivo", la [162, 171]

fm.

no:

necesarios

atención.

tipo correspondiente a

la DEK que por la

tencia por RU 22362 pero no por RU

el

afinidad que-

se sea el

afinidad que-

la excreta

normo-

del de la ALD)

excreta-

RU

de la

tipo en la 4E.

es

en la misma. con excreta

en estado

norma

,1041,

de predominio

investigación también indica

signos de

de [...], -ALDO [...], [129],
como [...], la transformación de
[...], la [...]
de [...], para transformar
[131], el [...]
con [...]-ALDO [...]

In condiciones no transformantes, incubando en frío
y en presencia de molibdato que inhibe la transformación
[129], la unión fue retenida principalmente en la DEAE-ca-
lulosa, que en el sistema utilizado retiene los complejos no
transformados, existiendo una baja unión a la ADN-calulo-
sa. Este efecto en los picos cromatográficos ha sido ad-
judicado a un cambio [...], la carga superficial de los recep-

[12,13] [...], una mayor afinidad
receptores [18,176], y ya ha sido descrito para
el receptor de [...], la ME [157,111]. Si bien este estu-
dio no permite [...], la especie [...]
[34]-ALDO [...], comparable al receptor de

[...], las formas transformadas
[...], la fracción unida de [ADP]
[...], que
han sido descritos en el [DN], pero que se forman
con ruptura proteolítica del receptor de [MO] en [e]

rata [176]. Estos resultados sugieren, entonces, que sitios de tipo β de (3H)-ALDO en la ME comparten una reactividad con los receptores de β de los efectos clásicos [12,23,31,175,177]. La transformación y la translocación nuclear podrían explicar la localización premitochondrial nuclear de 3H -ALDO por Birmingham col. [104] en la ME por autoradiografía.

En el cerebro, la ALDO y otros MC parecen influenciar el balance de electrolitos, el edema, la ingesta salina, la actividad eléctrica de las neuronas y ciertos comportamientos [106,169,173-182]. Aún no se conocen con certeza las acciones de la ALDO en la ME, y, debido a la complejidad del sistema de unión [35,163-170] y la menor concentración de sitios, su estudio puede acarrear ciertas dificultades. Sin embargo algunos de los efectos sobre el cerebro, que no involucren cambios en el comportamiento, podrían extenderse a la ME como posibles funciones de estos receptores.

VII. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN
LA MÉDULA ESPINAL: REGULACIÓN DE GLICEROL-FOSFATO
DESHIDROGENASA Y ORNITINA DESCARBOXILASA

La β -oxidación de los ácidos grasos, dependiente de la coenzima A, produce acetona fosfato, que es intermediario de la glucólisis; el glicerol-3-fosfato, formado a partir de los electrones del NADH extramitochondrial a la cadena respiratoria. El glicerol-fosfato atraviesa la membrana externa y reduce una flavoproteína de la membrana interna que permite la transferencia de los electrones. El glicerol-fosfato puede volver a salir de la mitocondria para volver a reducirse con el NADH extramitochondrial [184]. Esta enzima también sirve de nexo entre el metabolismo de los lípidos y la glucólisis. El glicerol-fosfato puede utilizarse en la síntesis de lípidos o bien incorporarse a la glucólisis como dihidroxiacetona-fosfato.

Si el β -PG se encuentra en diversos tejidos, su inducción se limita al tejido nervioso [186-189]. La inducción ha sido observada en diversas zonas del SN "in vivo", en el nervio óptico [189], pero no en diversos cultivos de tejido o células nerviosas, siendo muy estudiadas las líneas celulares de glioma [187,190-192]. La respuesta no fue detectable en fibroblastos, ni en células ependimarias, meníngeas o

neuronales [193,194]. Leveillé y col., utilizando anticuerpos contra *in situ*, encontraron inmunoreactividad específica *in situ* no en otros elementos celulares del SN.

La ODC (E.C.4.1.1.17) cataliza la descarboxilación del aminoácido ornitina (ORN) para rendir putrescina (1,3-bispropiléndiamina), que es el precursor de la síntesis de poliaminas [185]. La ODC es la enzima limitante de este camino biosintético. Las poliaminas desempeñan funciones importantes en la síntesis de proteínas [196] y la ODC se ha utilizado para investigar la acción de las hormonas en sus tejidos efectores [197]. Los GC aumentan la ODC hepática y renal, mientras que disminuyen la de timo y bazo [66,198,199] el cerebro Cousin y col. [66] demostraron que la ODC era aumentada específicamente por los GC, suministrados en una única dosis aguda.

En la ME, se han descrito la presencia de receptores citosólicos para los GC [97,134,157,II,III,IV] y se han señalado diversas acciones de estas hormonas como cambios en los niveles de neurotransmisores, la peroxidación lipídica, la transmisión sináptica y la excitabilidad nerviosa [44,93,99]. En esta sección se describen los efectos de los GC sobre las actividades de GPCH y ODC de la ME ya que en diversas zonas del SN son regulables por estos esteroides, y se los relaciona con la unión de la hormona al receptor citosó-

lido. Ambas enzimas aumentaron por tratamiento con GC y no por . El efecto sobre la GPDH se manifestó luego del tratamiento mientras que de la DDC fue más rápido (6h) mostrando un comportamiento bifásico. Los efectos hallados pudieron correlacionarse con la ocupación de los sitios receptores por la hormona inyectada, iniciando un mecanismo genómico e indican que los sitios receptores de GC estaban localizados en diferentes poblaciones celulares, siendo su localización preferentemente glial.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y TRATAMIENTO CON ESTEROIDES

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley con 2-7 días de ADX. Se disecaron la ME, el HC, el engrosamiento cervical y los nervios de la cola de caballo como se indicó anteriormente [134,II].

Los esteroides (Sigma) se suministraron en forma crónica en dosis y vías en las cuales producen efectos biológicos conocidos y específicos. Así, se administraron: CORT 200 µg/ml y DEX 10 µg/ml en la salina de bebida durante 4-7 días [20], ALDO 1 mg/ml en minibombas osmóticas que liberan 1 µg de esteroide/h (en estas condiciones los animales ADX reducen su ingesta salina al nivel de los intactos), y progesterona (5 mg/día), estradiol (50 µg/día) y testosterona (1 mg/día) inyectados s.c. disueltos en aceite vegetal diariamente durante 4 días [125].

El efecto de una dosis única de esteroides se estudió inyectando s.c. soluciones de 2,5 mg/ml en etanol-salina 40% en diferentes dosis (ver Resultados).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GPDH

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente siguiendo la desaparición de NADH, en presencia de dihidroxiacetona-fosfato, a 340 nm, según la metodología uti-

lizada por McGinnis y De Vellis [201]. El tejido homogenizó en 4 "Imenens buffer" contenía fosfato sódico 10 mM, pH 7,4. EDTA 1 mM, glicina de suero bovino 100 µg/ml. Se obtuvo el citosol centrifugando a 1000 g durante 30 min, del que se tomaron 3-4 fracciones para determinar proteínas [117], determinar la enzima luego se diluyó 1:5. La reacción se realizó en una cubeta de cuarzo de un espectrofotómetro Beckman DB-3 usando 0,5 ml de "buffer", 0,1 ml de fracción citosólica diluida (hasta 0,1 mg de proteína), 0,1 ml de NADH (Sigma, 0,067 mg/ml (concentración final 0,033 mM) y 0,02 ml de 1-hidroxidacetona-fosfato 5 mg/ml (concentración final 0,1 mM). Luego se agitar la mezcla, se tomaron lecturas de la transmittancia 15 segundos durante un intervalo de 0-3 min. La actividad enzimática se obtuvo de los datos calculó con una computadora HP 38 utilizando un programa escrito para el efecto. Figura 11-1 muestra diagrama de flujo que obtiene como resultado la regresión lineal de la recta resultante obtenidos. El coeficiente de correlación fue mayor a 0,99, siendo la concentración de NADH la concentración. Los resultados se expresan en µmol de NADH consumidos min/mg proteína.

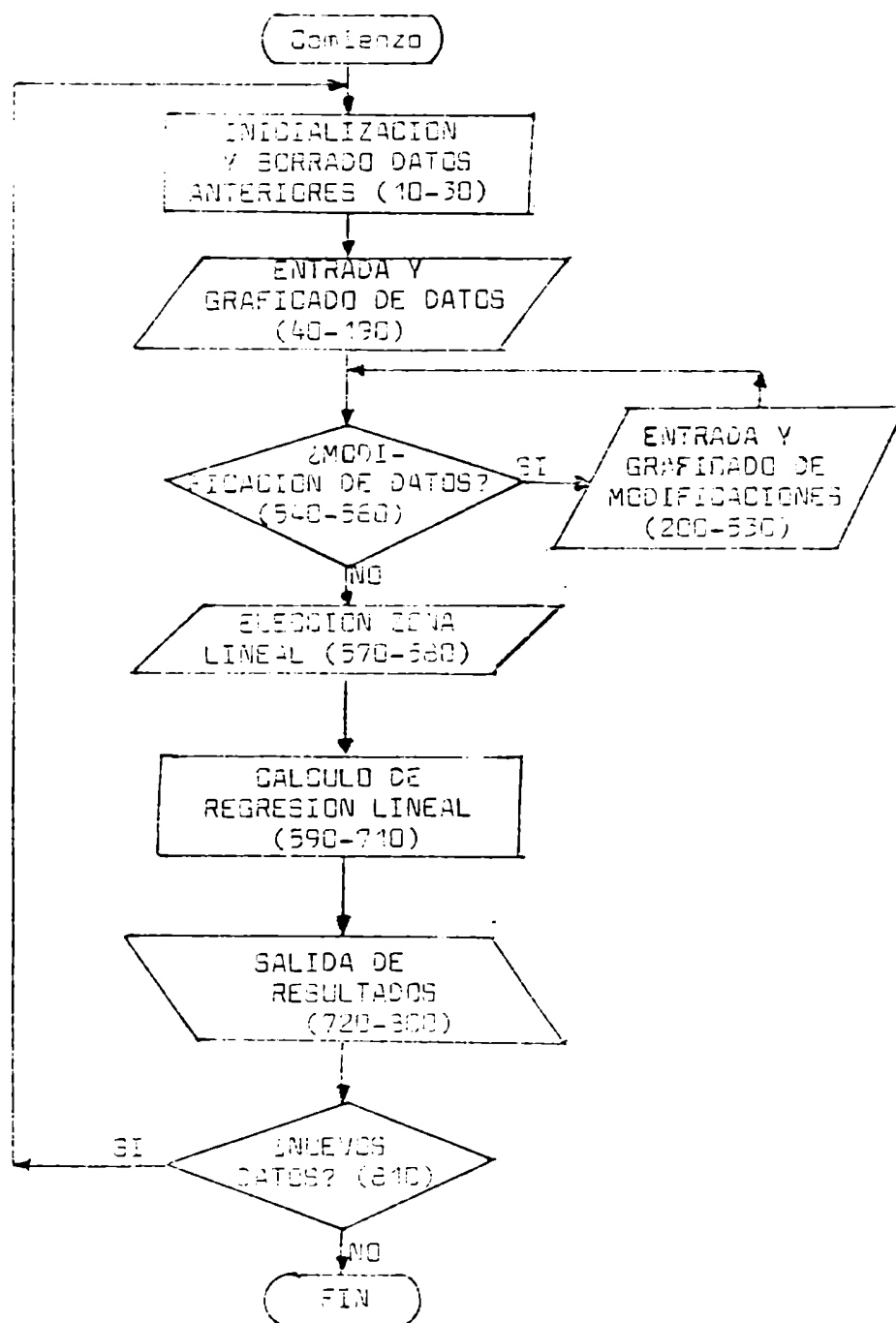


Figura VI-1 : Diagrama de flujo del programa para el cálculo de actividad de GPDH.

Los números entre paréntesis indican la numeración de las instrucciones comprendidas en cada bloque. Se utilizan como datos el tiempo y la transmitancia (%) a 340 nm, los resultados de actividad enzimática se obtienen en μ moles de NADH consumidos por minuto (ver apéndice VI-1).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ODC

La actividad de ODC se determinó midiendo la formación de ^{14}C - CO_2 a partir de L-(1- ^{14}C)-ORN (New England Nuclear, 52,6 Ci/mol) de acuerdo a Russell y Snyder [202]. La (^{14}C) -ORN se purificó para eliminar (^{14}C) - CO_2 evaporando la solución ácida (HCl 0,01 N) con corriente de nitrógeno bajo campana, redisolviendo en HCl 0,01 N y evaporando nuevamente. El residuo se disolvió en HCl 0,01 N (100 000 com/ μ i) y se conservó a 5 °C.

El tejido se homogenizó en 2 volúmenes de "buffer" que contenía fosfato de potasio 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, y azida sódica 2 g/l, pH 7,2 y se centrifugó en microcentrifuga (Fisher 235 B) a 12 000 rpm aproximadamente obteniéndose el sobrenadante. Se incubaron 0,1 ml en frascos con tapa de goma a 37 °C con 0,1 ml de "buffer" que contenía fosfato 50 mM, EDTA 2 mM, ORN (Sigma) 0,2 mM y fosfato de piridoxal (Sigma) 0,1 mM pH 7,2 y 4 μ l (400 000 cpm) de (^{14}C) -ORN [66]. Los frascos se taparon inmediatamente sellando la junta del tapón de goma con "Parafilm". El tapón de goma estaba atravesado por un alambre en cuyo extremo tenía adosado una celda plástica que contenía 0,2 ml de solubilizador de tejidos NCS (Amersham/Searle) para capturar el (^{14}C) - CO_2 liberado [203]. Luego de 1 h de incubación se inyectaron, a través del tapón, 0,3 ml de ácido tricloroacético 40% para detener la reacción y liberar al (^{14}C) - CO_2 de la solución [204].

Luego de 30 min adicionales para atrapar cuantitativamente el (^{14}C)- CO_2 liberado (si se incubaba 1 h en lugar de 30 min no había una mayor captación) se sacó el tapón y se colocó la celda plástica en un vial de vidrio al que se le agregaron 10 ml de tolueno centelleante para determinar la radioactividad. El blanco de reacción se determinó agregando el "buffer" de homogenización en lugar de sobrenadante.

En otra alícuota de sobrenadante se determinaron las proteínas por el método de Lowry [117].

En estas condiciones la producción de (^{14}C)- CO_2 fue lineal con el tiempo y con la concentración de proteínas (hasta 1,4 mg). La actividad enzimática se expresa en pmol de (^{14}C)- CO_2 /h/mg proteína.

DETERMINACION DE LA UNION CITOSOLICA DE (^3H)-DEX

Se homogenizó el tejido en 2-3 volúmenes de "buffer" TEMC (ver capítulo II) que contenía molibdato 20 mM y carbón-dextrán (2%-0,2%); para eliminar esteroide libre. Luego de centrifugar a 105 000 g 30 min, para obtener la fracción citosólica, la misma se incubó 3 h a 0 °C (para impedir el intercambio de sitios ocupados) con (^3H)-DEX 10 nM a fin de determinar la unión de acuerdo a nuestros estudios previos [134,II]. Los resultados se expresaron en fmoles de esteroide ligado/mg proteína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó ANOVA de los datos obtenidos, y se realizaron las comparaciones entre los únicos grupos por el test de "t" de Student y para comparaciones múltiples por el de Newman-Keuls. Los datos provenientes de la determinación de DDC no fueron homocedásticos, según el test de Bartlett, por lo cual previo al análisis estadístico debió realizarse una transformación logarítmica para satisfacer la condición de homocedasticidad.

RESULTADOS

EFFECTOS CRONICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE GPDH

La GPDH de ME se determinó a diversas concentraciones de sustratos, como se observa en la figura VI-2, observándose que a las concentraciones de trabajo (dihidroxiacetona-fosfato 0,7 mM, NADH 0,085 mM) se obtiene la velocidad máxima.

En estas condiciones se determinó la GPDH de animales que recibieron diversos tratamientos crónicos (tabla VI-1). La ADX de 4-7 días no produjo efectos significativos sobre la actividad de esta enzima, mientras que el tratamiento con GC naturales o sintéticos produjo un aumento significativo de la misma. La GPDH de los animales tratados con DEX fue 35% superior a la de los controles, mientras que la CORT aumentó 27% los niveles basales. En otros estudios realizados se observó que estos efectos persistían si el tratamiento hormonal era suspendido un día antes ($0,157 \pm 0,008$ vs. $0,241 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/min/mg}$, $n=3$, $p < 0,01$).

Otros esteroides suministrados en forma crónica no aumentaron la actividad de GPDH. La ALDO en dosis que inhibe el apetito salino, el estradiol y la testosterona en dosis fisiológicamente activas [125] no tuvieron efectos significativos. La progesterona, que también es un anti-

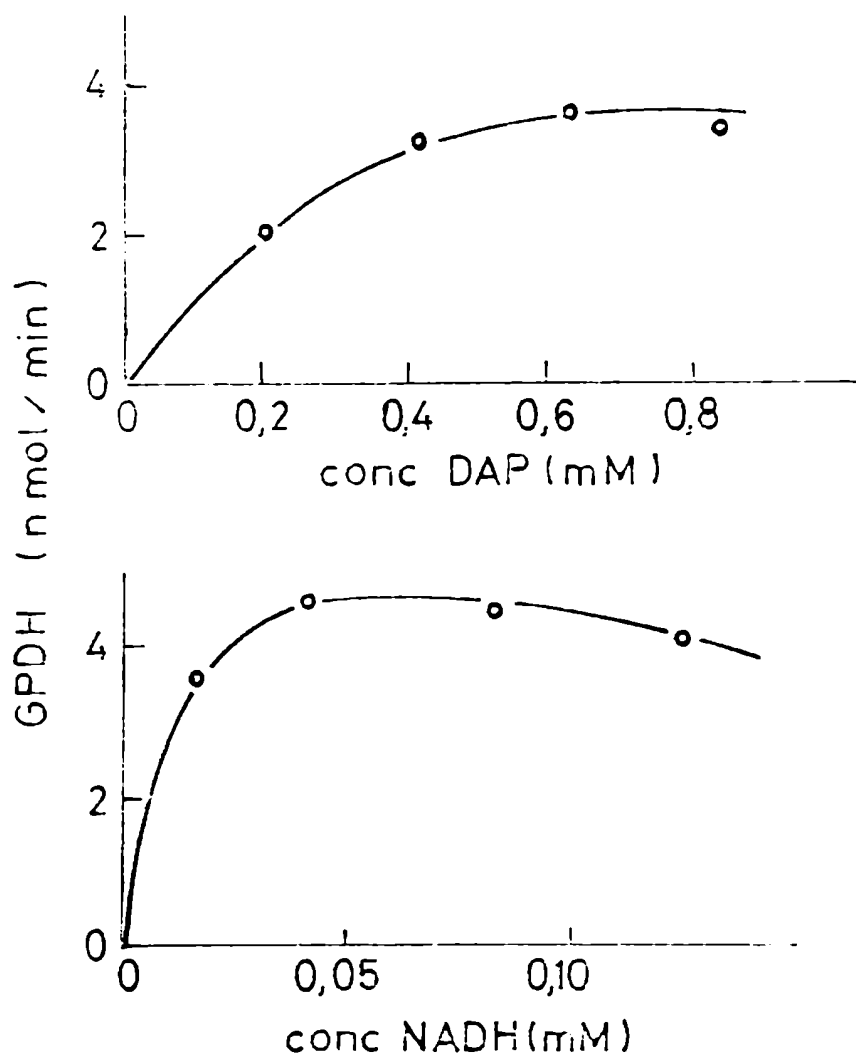


Figura VI-2 : Curvas de sustratos de la GPDH de ME.

Se determinó la actividad de GPDH en citosoles de ME, registrando espectrofotométricamente la desaparición de NADH a 340 nm,
 A : Se varió la concentración de dihidroxiacetona-fosfato (DAP) con una concentración inicial de NADH de 0,085 mM.
 B : Se varió la concentración de NADH utilizando DAP 0,7 mM.

Tabla VI-1: Efectos crónicos sobre la actividad de GPDH de la ME.

Exp. Nº	Control	n	Actividad de GPDH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$)	Tratamiento	n	Actividad de GPDH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$)
I	Intactos	4	$0,151 \pm 0,019$	ADX	4	$0,130 \pm 0,008$
II	ADX	4	$0,113 \pm 0,006$	ADX+DEX	3	$0,152 \pm 0,007^*$
III	ADX	5	$0,147 \pm 0,006$	ADX+CORT	5	$0,187 \pm 0,015^*$
IV	ADX	6	$0,107 \pm 0,006$	ADX+ALDO	6	$0,091 \pm 0,004$
V	ADX		$0,153 \pm 0,10$	ADX+PROG	4	$0,106 \pm 0,001^*$
				ADX+E ₂	4	$0,133 \pm 0,010$
				ADX+TESTO	4	$0,156 \pm 0,009$

Se determinó espectrofotométricamente la actividad de GPDH en citosoles de ME de ratas macho intactas (Intactos), ADX de 4-7 días, ADX tratadas con DEX (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en la salina de bebida durante 5-7 días, ALDO (1 $\mu\text{g}/\text{h}$) por minibombas osmóticas durante 5 días, progesterona (PROG, 5 $\text{mg}/\text{día}$), estradiol (E₂, 50 $\mu\text{g}/\text{día}$) y testosterona (TESTO, 1 $\text{mg}/\text{día}$) inyectados s.c. disueltos en aceite durante 4 días (n=número de casos estudiados).

*: $p < 0,05$ vs. control.

GC [123], disminuyó en forma significativa la actividad de GPDH.

EFFECTOS CRONICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE ODC

La tabla VI-2 muestra el efecto de la DEX y la CORT suministrados en la salina de bebida a animales ADX. Ambos esteroides aumentan la actividad, existiendo una gran variabilidad entre los animales sometidos al tratamiento prolongado. En otro experimento se encontró que la ODC en los animales intactos se encuentra significativamente disminuida ($p < 0,05$) respecto de los ADX ($12,3 \pm 0,9$, $n=4$ vs. $25,3 \pm 4,7$ pmol/mg/h, $n=3$). Si a animales ADX tratados con DEX se les suspendía el tratamiento un día antes, se encontraba una disminución similar (50%) de la ODC ($17,5 \pm 3,5$ vs. $9,4 \pm 0,2$ pmol/mg/h, $n=4$, $p < 0,05$). Esto demuestra que los GC pueden modificar la actividad de ODC en forma drástica pero bifásica. Esta variabilidad puede ser debida a que las hormonas tienen un efecto diferente relacionado con el tiempo y sus concentraciones plasmáticas, las que dependen del horario de ingesta del fluido que contenía GC. Mientras que para la GPDH el tratamiento crónico es un modelo eficaz para estudiar su regulación por GC, para la ODC es conveniente utilizar tratamientos más reproducibles, como por ejemplo la inyección de cantidades definidas y a tiempos establecidos de las hormonas.

Tabla VI-2: Efectos crónicos de GC sobre la actividad de ODC de la ME.

Control	n	Actividad de ODC (pmol/mg prot./h)	Tratamiento	n	Actividad de ODC (pmol/mg prot./h)
ADX	5	16,6 ± 3,1	ADX+DEX	3	40,5 ± 14,2
			ADX+CORT	5	28,2 ± 3,1*

Se determinó la actividad de ODC en sobrenadantes de ME de ratas macho ADX de 4-7 días. Los tratamientos con DEX y CORT se realizaron por la salina de bebida en concentraciones de 10 y 100 µg/ml respectivamente (n=número de casos estudiados).

*: $p < 0,05$ vs. ADX control.

CINETICA DEL EFECTO DE UNA UNICA DOSIS DE GC SOBRE GPDH, ODC Y LA UNION CITOSOLICA DE (³H)-DEX

Para comprender mejor los cambios que producen los GC en las actividades enzimáticas es necesario conocer el tiempo que necesitan para manifestar su efecto. La determinación de los sitios de unión citosólicos para GC, en condiciones en las que no está favorecido el intercambio de esteroide unido con el libre radioactivo (tiempos relativamente cortos y bajas temperaturas), serviría para inferir la ocupación y/o depleción de estos sitios por la hormona inyectada posibilitando relacionar la unión al receptor con el efecto enzimático.

En este estudio se inyectó una dosis elevada de fosfato de DEX, que es un GC potente y de rápida asimilación, muy utilizado en los tratamientos farmacológicos. La figura VI-3 muestra que hasta las 6 h no se produce efecto sobre la GPDH, estando la actividad enzimática aumentada recién a las 20 h. A los 2 días (48h) todavía persiste un aumento significativo. El efecto sobre la ODC es diferente, ya que no hay cambios a las 2 h, pero sí a las 4 h, alcanzándose un máximo que cuadruplica al estado basal a las 6 h. Sin embargo, a las 20 h se encuentra una marcada disminución de la actividad, siendo esta menos de la mitad de la inicial. La figura VI-4 muestra el gráfico de las inversas de acuerdo al método de Lineweaver-Burk obtenido con

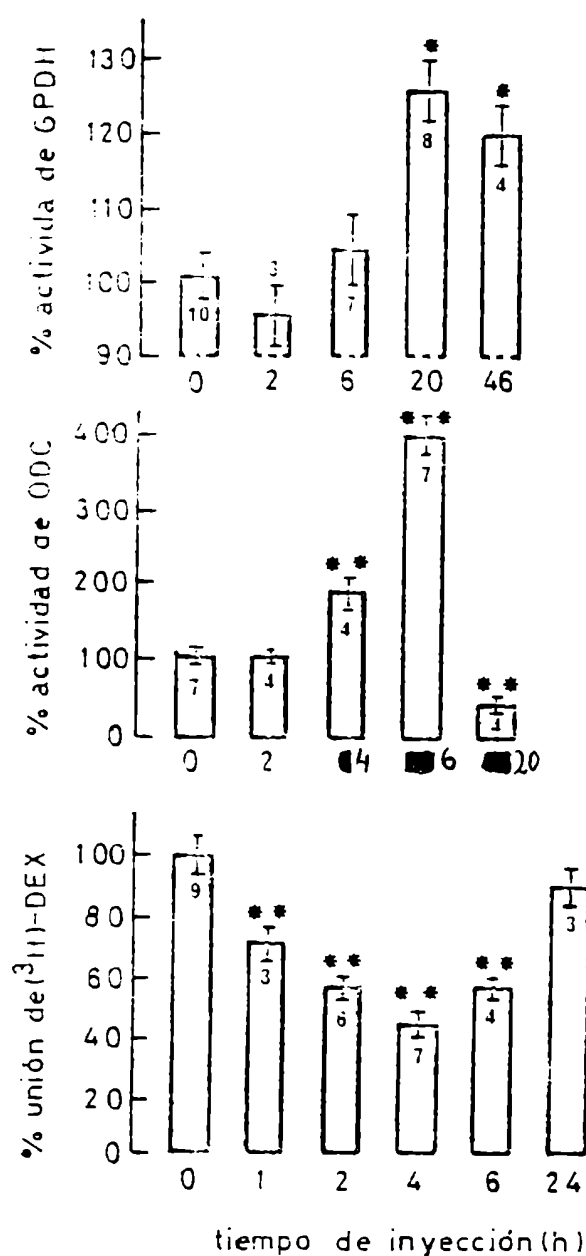


Figura VI-3 : Respuesta temporal de las actividades enzimáticas y la unión de (3H)-DEX a una única dosis de fosfato de DEX.

A ratas ADX se les suministró 5 mg/kg peso s.c. de fosfato de DEX. En los tiempos indicados se determinaron las actividades enzimáticas de ODC y GPDH y la unión citosólica de (3H)-DEX luego de 3 h de incubación a 0 °C. Los resultados se expresan en porcentaje del control (tiempo= 0 h), animales que no fueron inyectados, como medias \pm ES. En las barras se indica el número de casos estudiados.

* : $p < 0,05$ vs. control

** : $p < 0,01$ vs. control.

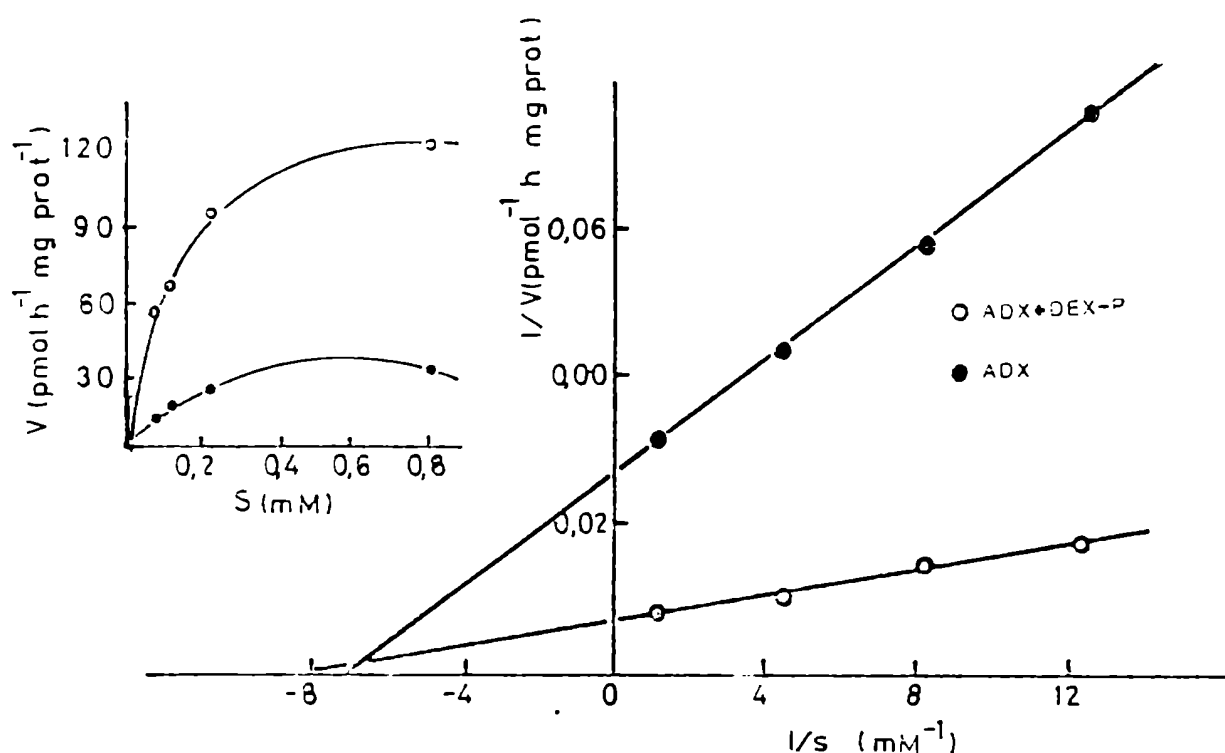


Figura VI-4 : Gráfico de las inversas de la actividad de ODC en ME.

Se determinó la actividad de ODC en sobrenadantes de ME de ratas ADX (●) y ADX inyectadas con DEX-P (5 mg/kg peso s.c.) 5 h antes del sacrificio (○) atrapando y contando la radioactividad del $(^{14}\text{C})\text{-CO}_2$ liberado de un medio de incubación que contenía 400 000 cpm de $(^{14}\text{C})\text{-ORN}$ y concentraciones variables de ORN. Las concentraciones indicadas corresponden a la suma de sustrato marcado y no radioactivo. En el apartado se grafican las concentraciones vs. la velocidad inicial, en el gráfico central las inversas.

ADX : $V_{\text{max}} = 37,7 \text{ pmol h}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ $K_m = 0,14 \text{ mM}$.
 ADX+ DEX-P : $V_{\text{max}} = 142,3 \text{ pmol h}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ $K_m = 0,12 \text{ mM}$.

ME de ratas ADX y ADX inyectadas con fosfato de DEX 6 h antes, donde se observa el efecto anterior. La velocidad máxima es casi 4 veces superior en las preparaciones de animales tratados, mientras que no hay cambios en la constante de Michaelis (K_m).

La unión citosólica de (3H)-DEX se encuentra disminuída a solo 1 h de la inyección, y los valores más bajos de unión se obtienen a las 4 h. A las 6 h ya son ligeramente más elevados y 1 día después se encuentran normalizados. Es decir que el primer cambio observado luego de una única dosis de GC es una disminución de sitios de unión citosólicos, seguido de un gran aumento de la ODC. A las 20-24 h se evidencia el aumento de la GPDH, cuando ya se restablecieron los sitios de unión y la ODC cayó a valores inferiores a los basales.

RESPUESTA A DIFERENTES DOSIS DE GC

La figura VI-5 muestra el efecto producido por una única inyección de fosfato de DEX administrada con la suficiente antelación para lograr el efecto máximo. Así, para GPDH se tomaron 20 h mientras que 6 h fueron óptimas para la ODC y 4 h para la unión citosólica (ver figura VI-3). Ambas enzimas responden a las mismas dosis de fosfato de DEX, siendo 0,2 mg/kg peso la mínima dosis efectiva para ellas. La unión citosólica de (3H)-DEX disminuye al aumentar las dosis de GC inyectado, y esta variación es paralela al efecto producido sobre las

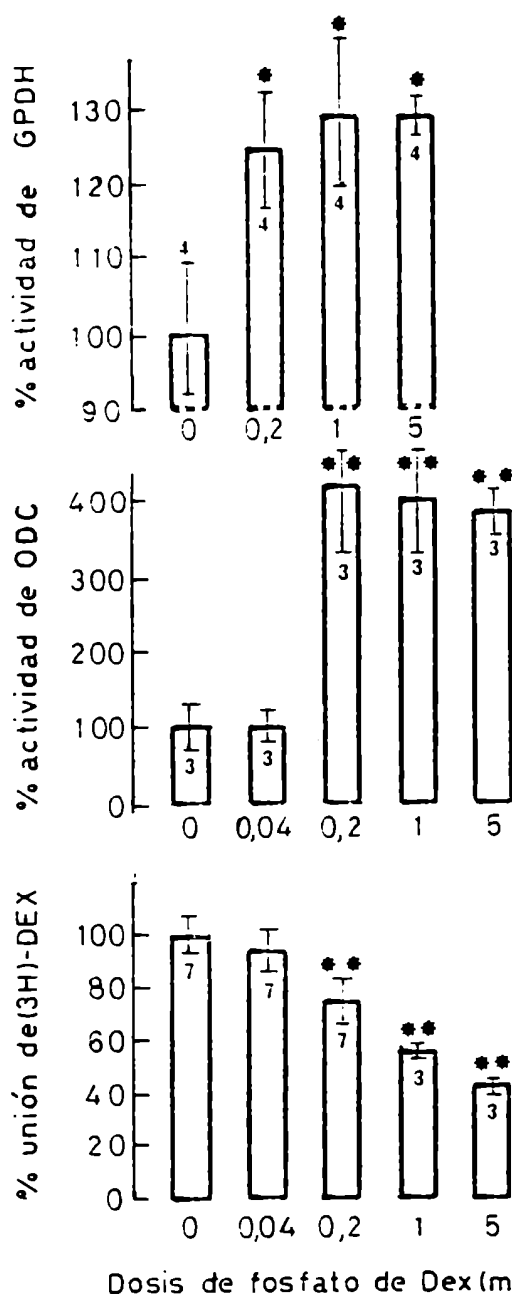


Figura VI-5 : Respuesta de las actividades enzimáticas y de la unión de (3H)-DEX a diferentes dosis únicas de fosfato de DEX.

A ratas ADX se les suministraron las dosis indicadas de fosfato de DEX s.c.. Luego de 6 h se sacrificaron para determinar la actividad de ODC, a las 20 h la actividad de GPDH y a las 4 h para la unión citosólica de (3H)-DEX. Se representan las medias \pm ES de los porcentajes respecto de los controles (dosis= 0 mg/kg) que recibieron solamente el vehículo. En las barras se indica el número de casos estudiados.

* : $p < 0,05$ vs. control.

** : $p < 0,01$ vs. control.

actividades enzimáticas. Mientras que una dosis de 0,04 mg/kg peso no produce efecto significativo, una dosis de 0,2 mg/kg o mayor disminuye significativamente la unión citosólica indicando que la hormona inyectada se unió a los receptores.

ESPECIFICIDAD DEL EFECTO SOBRE ODC

En la tabla VI-1 se muestran los datos sobre el efecto de diferentes esteroides sobre la actividad de GPDH. Una vez establecidas las condiciones en las cuales se observa un aumento reproducible de la actividad de ODC, fue posible determinar el efecto de los distintos esteroides. Se inyectaron a ratas ADX con esteroides 5 mg/kg s.c. 6 h antes del sacrificio (tabla VI-3). De esta manera se observó que todos los corticoides (DEX, CORT y ALDO) producían el marcado aumento de la ODC, mientras que los esteroides sexuales y la progesterona no modificaron significativamente los valores basales. Si la dosis inyectada era diez menor (0,5 mg/kg) la DEX y la CORT todavía eran efectivas y aumentaban la ODC, mientras que la ALDO ya no tenía efecto sobre su actividad.

DISTRIBUCION DE LOS NIVELES BASALES Y ESTIMULADOS DE GPDH Y ODC

Se determinaron las actividades enzimáticas en tres

Tabla VI-3: Efecto de esteroides sobre la actividad de ODC de la ME.

Inyección	n	Actividad de ODC (pmol/mg prot./h)	% del control
VEHICULO	7	24 \pm 2,5	-
DEX (5mg/kg)	4	104 \pm 8,2 **	423
" (0,5mg/kg)	3	60 \pm 8,7 **	250
CORT (5mg/kg)	4	92 \pm 8,6 **	383
" (0,5mg/kg)	3	46 \pm 2,5 *	192
ALDO (5mg/kg)	4	87 \pm 17,2 **	362
" (0,5mg/kg)	3	28 \pm 5,2	117
PROG (5mg/kg)	4	19 \pm 2,3	79
TESTO (5mg/kg)	4	22 \pm 6,9	92
E ₂ (5mg/kg)	4	28 \pm 7,4	117

Se determinó la actividad de ODC en sobrenadantes de ME de ratas ADX inyectadas 6 h antes con vehículo (etanol-salina 40 %), DEX, CORT, ALDO, progesterona (PROG), testosterona (TESTO) y estradiol (E₂) s.c. en las dosis indicadas (n=número de casos estudiados).

** : $p < 0,01$ vs. control (vehículo).

* : $p < 0,05$ vs. control (").

zonas bien diferenciadas del SN de ratas ADX y ADX tratadas con GC. Se tomó el HC, que es la zona con mayor densidad de receptores de GC del cerebro [105], el engrosamiento cervical de la ME, que es una zona rica en receptores de GC y que muestra altos niveles de GC endógenos [134, 157,II,IV] y la cola de caballo que contiene menos receptores [134,II] pero está constituida por prolongaciones nerviosas. Esta última zona se asemeja al nervio óptico, donde se encontraron receptores de GC con propiedades "in vivo" diferentes a los del HC [157,II,65]. Para aumentar la actividad de GPDH se utilizó el tratamiento crónico con DEX mientras que para ODC se utilizó una dosis única del éster fosfórico. En la figura VI-6 se observa que los valores basales más elevados de GPDH se encontraron en el engrosamiento cervical, siendo los de la cola de caballo menores y los del HC aún más bajos. La DEX aumentó significativamente la actividad en el HC y el engrosamiento cervical pero no en la cola de caballo. Los niveles basales de ODC fueron similares en las tres zonas estudiadas, y en todas ellas el tratamiento con GC elevó marcadamente su actividad, siendo la estimulación menor en el HC que en las otras dos zonas.

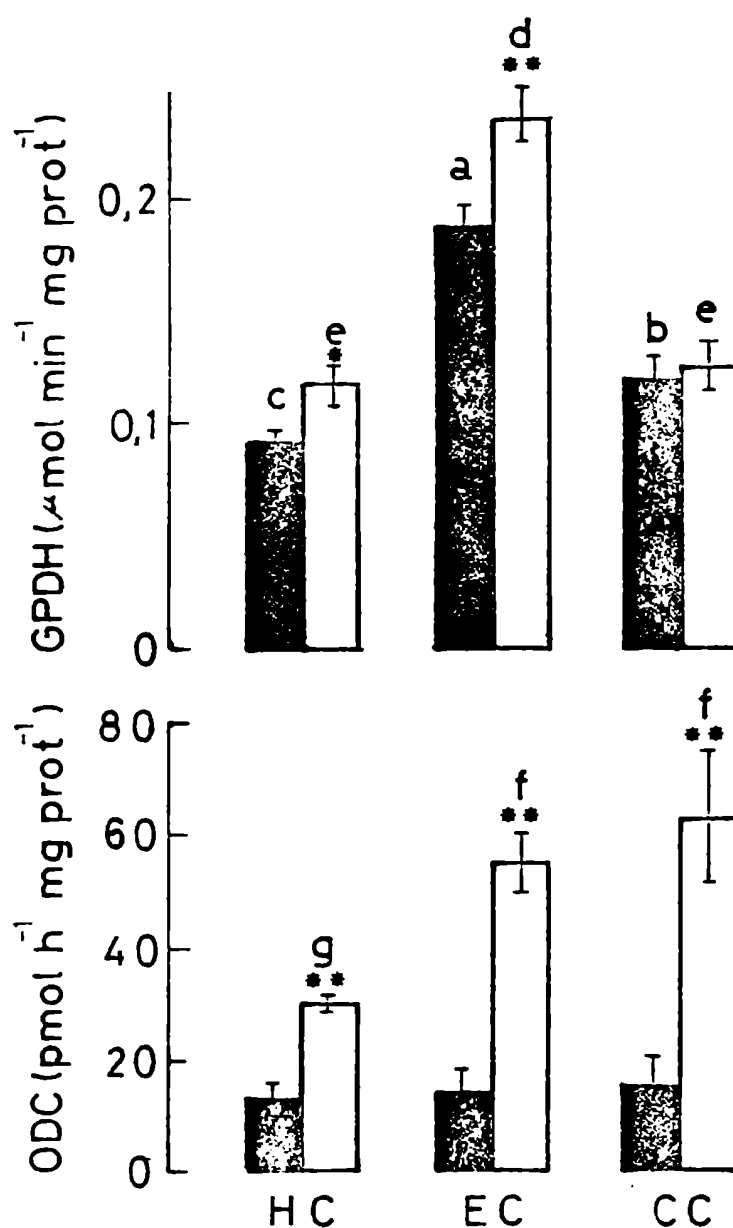


Figura VI-6 : Distribución en zonas del SN de las actividades enzimáticas.

Se determinó la actividad de ODC en HC, engrosamiento cervical (EC) y cola de caballo (CC) de ratas ADX (■) y ADX inyectadas con 5 mg/kg peso de fosfato de DEX s.c. 6 h antes del sacrificio (□, n=4). La GPDH fue determinada en las mismas zonas de ratas ADX (■) y ADX tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de DEX en salina de bebida durante 5 días (□, n=5):

* : $p < 0,05$ vs. ADX de la misma zona.

** : $p < 0,01$ vs. ADX de la misma zona.

DISCUSION

En este estudio se demuestra que los GC aumentan la GPDH de ME en tratamientos prolongados. El efecto es específico de GC, ya que la ALDO suministrada en dosis en las cuales regula el apetito salino no produce variación. Tampoco son efectivos la testosterona y el estradiol. La progesterona produce el efecto contrario y reduce la actividad de GPDH. Teniendo en cuenta las propiedades anti-GC de la progesterona [123] se podría inferir que la inhibición sea producida por bloqueo del receptor de GC. Sin embargo el efecto de la progesterona se observa en animales ADX, en los cuales el receptor de GC no es ocupado por sus agonistas y por lo tanto no podría esperarse que se manifieste la actividad anti-GC de la progesterona. Es probable que la acción de la progesterona se produzca por interacción con un sitio diferente o modificando las poblaciones celulares, especialmente aquellos tipos donde se expresa la actividad de GPDH.

Los cambios producidos por los GC en la GPDH son del 20-50% de los valores basales, de acuerdo con el efecto encontrado en otras regiones del SN [65,189]. La ADX no tuvo efecto sobre la actividad de los animales intactos en reposo, lo cual sugiere que la regulación de la GPDH se realiza en presencia de amplias variaciones de los GC circulan-

tes, como en tratamientos farmacológicos y el estrés.

La ODC fluctuó marcadamente luego de diferentes tratamientos hormonales. Este hecho está de acuerdo con la propiedad de esta enzima, que es la de mayor índice de recambio y menor tiempo de vida media conocida entre las enzimas de mamíferos [205]. Los GC producen un aumento de 4 veces a tiempos relativamente cortos (6 h) mientras que luego de 20 h de suministrados su actividad se halla reducida. Este efecto bifásico es explicado por la rápida degradación a la que es sometida luego que el efecto sobre su síntesis ha cesado, y es posible que la baja actividad encontrada en el tejido de animales intactos pueda ser debida a las fluctuaciones diarias de los GC circulantes [152], encontrándose disminuída varias horas después del pico de máxima concentración sérica. La persistencia del efecto sobre la GPDH luego de 2 días de la inyección de GC o al interrumpir por 1 día el tratamiento crónico revela un mayor tiempo de vida media de esta enzima.

El aumento de ODC fue específico para corticoides, ya que mientras altas dosis de DEX, CORT y ALDO eran efectivas, la progesterona, el estradiol y la testosterona no tenían efecto. Al suministrar dosis menores se evidenció la especificidad para los GC, ya que DEX y CORT mantuvieron su efecto y el de ALDO ya no era observable. La ALDO en altas concentraciones es capaz de unirse a los receptores de tipo II,

que tienen baja afinidad por este ligando y mayor afinidad por los GC [V], y de esta manera tener efecto de GC. A bajas concentraciones ALDO solo puede unirse al sitio de MC (de tipo I) y por lo tanto no posee actividad de GC.

Los estudios efectuados con una única dosis de GC evidencian la correlación existente entre la ocupación de los sitios receptores de GC y la respuesta. El primer cambio detectado en los tres parámetros determinados (unión citosólica, actividad de GPDH y ODC) fue la disminución de los receptores. Esta caída de la unión debe interpretarse como ocupación de receptores por la hormona inyectada, ya que la determinación se realizó en condiciones que no favorecen el intercambio, o por depleción de la unión citosólica por translocación al núcleo. La ocupación/depleción de los receptores precede en por lo menos 2 h al aumento de la ODC y en 5 h o más al de la GPDH, lo que implicaría que el primer paso de los efectos observados es la unión del esteroide al receptor. Las curvas dosis-respuesta avalan esta observación ya que la mínima dosis efectiva para aumentar las actividades enzimáticas es también efectiva para detectar la ocupación/depleción de los receptores. Estos resultados indican que los GC serían capaces de inducir la GPDH y la ODC en la ME, como ocurre en otras regiones del SN [65,66,186,187]. En efecto; McGinnis y de Vellis comprobaron que el aumento de GPDH en células nerviosas era debi-

do a la acumulación de ARN mensajero y aumento de la síntesis de la enzima [192,206]. Kumar y col. determinaron un aumento de ARN poliA + específico para GPDH en cultivos de células gliales [207]. El aumento de ODC por GC en el SN y otros tejidos ha sido atribuida a una mayor concentración de enzima y no a cambios post-traduccionales [66,198,199,205,208,209]. Debe mencionarse que la completa demostración de la inducción de estas enzimas en la ME requiere la determinación de la proteína específica, para la GPDH se ha demostrado por métodos inmunoquímicos que la actividad enzimática es representativa de la concentración de enzima ya que la GPDH en sus estados basal e inducida no era diferenciable [210]..

Los diferentes tiempos de inducción de las enzimas de la ME sugieren mecanismos de acción diferentes. Al igual que en la estimulación por GC de la fosfodiesterasa alcalina I de células de hepatoma, la GPDH de la ME tiene un período latente de cierta consideración [211], lo cual puede hacer pensar que existe un intermediario [9]. La inducción de ODC en la ME se asemeja a la de tirosina-amino-transferasa de células de hepatoma, que es un efecto transcripcional directo, ya que ambas aumentan en un período corto de 2-4 h [9].

La heterogeneidad en las respuestas de las actividades enzimáticas al tratamiento con GC en distintas zonas

del SN, como así también las diferencias entre los niveles basales de GPDH, sugiere la existencia de poblaciones celulares diferentes que responden a los GC con características propias. La GPDH se localiza selectivamente en los oligodendrocitos [195], células gliales que forman la vaina de mielina en el SNC, mientras que la ODC puede ser estimulada tanto en células gliales como neuronales [212]. De estos resultados se desprende que en la ME se encuentran receptores para GC ampliamente distribuidos en células gliales. Los oligodendrocitos serían responsables de las variaciones de GPDH y los astrocitos, que son las células gliales más abundantes en todo el SNC, podrían ser los responsables, en parte, de la respuesta de la ODC. El aumento de ODC por GC se produce en forma generalizada en todas las zonas del SN, lo cual está más de acuerdo con la relativa uniformidad de los astrocitos que con la extrema diversidad de las neuronas en diferentes regiones del SNC. Sin embargo tampoco pueden descartarse como efectores involucrados en estos cambios, ciertas poblaciones neuronales que, según estudios autorradiográficos [103,104], retienen GC. Las células gliales, y en especial los astrocitos, son actualmente consideradas como importantes efectores de los GC en el tejido nervioso [213-216]. Debido a la importancia metabólica de las enzimas estudiadas, los GC tendrían tanto en la ME como en el resto del SN una función

reguladora del metabolismo. Estos efectos se hacen evidentes en la protección que producen estas hormonas en los casos de traumatismos del SN [44] en los que se desarrolla una intensa actividad trófica y proliferación de las células gliales.

Estas enzimas, y en especial la ODC por la magnitud de su respuesta, pueden ser utilizadas como marcadoras selectivas de la actividad de los GC en la ME y el SN en general, acompañadas con la determinación de otros parámetros bioquímicos de importancia biológica como la unión citosólica, la unión de complejos hormona-receptor a ADN-celulosa, etc. , que permitan evaluar de una manera más integral las complejas acciones de los GC en el SN.

Apéndice VI-1 : Listado de las instrucciones en "BASIC" del programa para el cálculo de la actividad de GPDH de la figura VI-1. A la derecha de cada instrucción figura su numeración.

```

10 DIM X(5)
20 DIM Y(5)
30 ALPHA=0
40 DISP "Entrar: T, % TRANS. (ordenados por tiempos precedentes)."
50 INPUT T(1), TRANS(1)
60 XMAX=100: YMAX=100: XMIN=0
70 SCALE=0.1*YMAX/XMAX
80 XAXIS=0.1
90 YAXIS=0.10
100 I=1
110 DISP "Entrar: T, % TRANS. (ordenados por tiempos precedentes)."
120 DISP "Como ultimo punto entrar 0,0"
130 ALPHA
140 INPUT T(I), TRANS(I)
150 IF T(I)=0 THEN GOTO 540
160 X=XMAX*(T(I)-T(1))/(T(5)-T(1))
170 Y=YMAX*(TRANS(I)-TRANS(1))/(TRANS(5)-TRANS(1))
180
190
200
210 DISP "SACAR: AB:"
220 INPUT AB
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990

```

```

510 FOR I=1 TO N-1
520 READ X(I), Y(I)
530 NEXT I
540 DIM A(100), B(100), C(100), D(100), E(100), F(100), G(100), H(100)
550 DIM I(100), J(100), K(100), L(100), M(100), N(100), O(100), P(100), Q(100), R(100), S(100), T(100), U(100), V(100), W(100), X(100), Y(100), Z(100)
560 IF N=1 THEN GOTO 570
570 DIM PCB(100), PCB2(100), PCB3(100), PCB4(100), PCB5(100), PCB6(100), PCB7(100), PCB8(100), PCB9(100), PCB10(100), PCB11(100), PCB12(100), PCB13(100), PCB14(100), PCB15(100), PCB16(100), PCB17(100), PCB18(100), PCB19(100), PCB20(100), PCB21(100), PCB22(100), PCB23(100), PCB24(100), PCB25(100), PCB26(100), PCB27(100), PCB28(100), PCB29(100), PCB30(100), PCB31(100), PCB32(100), PCB33(100), PCB34(100), PCB35(100), PCB36(100), PCB37(100), PCB38(100), PCB39(100), PCB40(100), PCB41(100), PCB42(100), PCB43(100), PCB44(100), PCB45(100), PCB46(100), PCB47(100), PCB48(100), PCB49(100), PCB50(100), PCB51(100), PCB52(100), PCB53(100), PCB54(100), PCB55(100), PCB56(100), PCB57(100), PCB58(100), PCB59(100), PCB60(100), PCB61(100), PCB62(100), PCB63(100), PCB64(100), PCB65(100), PCB66(100), PCB67(100), PCB68(100), PCB69(100), PCB70(100), PCB71(100), PCB72(100), PCB73(100), PCB74(100), PCB75(100), PCB76(100), PCB77(100), PCB78(100), PCB79(100), PCB80(100), PCB81(100), PCB82(100), PCB83(100), PCB84(100), PCB85(100), PCB86(100), PCB87(100), PCB88(100), PCB89(100), PCB90(100), PCB91(100), PCB92(100), PCB93(100), PCB94(100), PCB95(100), PCB96(100), PCB97(100), PCB98(100), PCB99(100), PCB100(100)
580 INPUT PCB1, PCB2, PCB3, PCB4, PCB5, PCB6, PCB7, PCB8, PCB9, PCB10, PCB11, PCB12, PCB13, PCB14, PCB15, PCB16, PCB17, PCB18, PCB19, PCB20, PCB21, PCB22, PCB23, PCB24, PCB25, PCB26, PCB27, PCB28, PCB29, PCB30, PCB31, PCB32, PCB33, PCB34, PCB35, PCB36, PCB37, PCB38, PCB39, PCB40, PCB41, PCB42, PCB43, PCB44, PCB45, PCB46, PCB47, PCB48, PCB49, PCB50, PCB51, PCB52, PCB53, PCB54, PCB55, PCB56, PCB57, PCB58, PCB59, PCB60, PCB61, PCB62, PCB63, PCB64, PCB65, PCB66, PCB67, PCB68, PCB69, PCB70, PCB71, PCB72, PCB73, PCB74, PCB75, PCB76, PCB77, PCB78, PCB79, PCB80, PCB81, PCB82, PCB83, PCB84, PCB85, PCB86, PCB87, PCB88, PCB89, PCB90, PCB91, PCB92, PCB93, PCB94, PCB95, PCB96, PCB97, PCB98, PCB99, PCB100
590 N=PCB1+PCB2+PCB3+PCB4+PCB5+PCB6+PCB7+PCB8+PCB9+PCB10+PCB11+PCB12+PCB13+PCB14+PCB15+PCB16+PCB17+PCB18+PCB19+PCB20+PCB21+PCB22+PCB23+PCB24+PCB25+PCB26+PCB27+PCB28+PCB29+PCB30+PCB31+PCB32+PCB33+PCB34+PCB35+PCB36+PCB37+PCB38+PCB39+PCB40+PCB41+PCB42+PCB43+PCB44+PCB45+PCB46+PCB47+PCB48+PCB49+PCB50+PCB51+PCB52+PCB53+PCB54+PCB55+PCB56+PCB57+PCB58+PCB59+PCB60+PCB61+PCB62+PCB63+PCB64+PCB65+PCB66+PCB67+PCB68+PCB69+PCB70+PCB71+PCB72+PCB73+PCB74+PCB75+PCB76+PCB77+PCB78+PCB79+PCB80+PCB81+PCB82+PCB83+PCB84+PCB85+PCB86+PCB87+PCB88+PCB89+PCB90+PCB91+PCB92+PCB93+PCB94+PCB95+PCB96+PCB97+PCB98+PCB99+PCB100
600 IF N=0 THEN GOTO 610
610 A=PCB1, B=PCB2, C=PCB3, D=PCB4, E=PCB5, F=PCB6, G=PCB7, H=PCB8, I=PCB9, J=PCB10, K=PCB11, L=PCB12, M=PCB13, N=PCB14, O=PCB15, P=PCB16, Q=PCB17, R=PCB18, S=PCB19, T=PCB20, U=PCB21, V=PCB22, W=PCB23, X=PCB24, Y=PCB25, Z=PCB26
620 FOR J=1 TO N
630 A=PCB1, B=PCB2, C=PCB3, D=PCB4, E=PCB5, F=PCB6, G=PCB7, H=PCB8, I=PCB9, J=PCB10, K=PCB11, L=PCB12, M=PCB13, N=PCB14, O=PCB15, P=PCB16, Q=PCB17, R=PCB18, S=PCB19, T=PCB20, U=PCB21, V=PCB22, W=PCB23, X=PCB24, Y=PCB25, Z=PCB26
640 B=PCB1, C=PCB2, D=PCB3, E=PCB4, F=PCB5, G=PCB6, H=PCB7, I=PCB8, J=PCB9, K=PCB10, L=PCB11, M=PCB12, N=PCB13, O=PCB14, P=PCB15, Q=PCB16, R=PCB17, S=PCB18, T=PCB19, U=PCB20, V=PCB21, W=PCB22, X=PCB23, Y=PCB24, Z=PCB25
650 F=PCB1, G=PCB2, H=PCB3, I=PCB4, J=PCB5, K=PCB6, L=PCB7, M=PCB8, N=PCB9, O=PCB10, P=PCB11, Q=PCB12, R=PCB13, S=PCB14, T=PCB15, U=PCB16, V=PCB17, W=PCB18, X=PCB19, Y=PCB20, Z=PCB21
660 G=PCB1, H=PCB2, I=PCB3, J=PCB4, K=PCB5, L=PCB6, M=PCB7, N=PCB8, O=PCB9, P=PCB10, Q=PCB11, R=PCB12, S=PCB13, T=PCB14, U=PCB15, V=PCB16, W=PCB17, X=PCB18, Y=PCB19, Z=PCB20
670 H=PCB1, I=PCB2, J=PCB3, K=PCB4, L=PCB5, M=PCB6, N=PCB7, O=PCB8, P=PCB9, Q=PCB10, R=PCB11, S=PCB12, T=PCB13, U=PCB14, V=PCB15, W=PCB16, X=PCB17, Y=PCB18, Z=PCB19
680 NEXT J
690 I1=(H-A*B/N), F=H-I1/N, PENDIENTE
700 J=B/N-I1*A/N, ORDENADA AL ORIGEN
710 L=H-A*B/N, D=H-I1/N, F=H-I1/N, G=H-I1/N, I=H-I1/N, J=H-I1/N, K=H-I1/N, L=H-I1/N, M=H-I1/N, N=H-I1/N, O=H-I1/N, P=H-I1/N, Q=H-I1/N, R=H-I1/N, S=H-I1/N, T=H-I1/N, U=H-I1/N, V=H-I1/N, W=H-I1/N, X=H-I1/N, Y=H-I1/N, Z=H-I1/N
720 DISP "DISEÑO DE LA LÍNEA DE TRANSFERENCIA DE DATOS" : "PCB1=PCB2=PCB3=PCB4=PCB5=PCB6=PCB7=PCB8=PCB9=PCB10=PCB11=PCB12=PCB13=PCB14=PCB15=PCB16=PCB17=PCB18=PCB19=PCB20=PCB21=PCB22=PCB23=PCB24=PCB25=PCB26=PCB27=PCB28=PCB29=PCB30=PCB31=PCB32=PCB33=PCB34=PCB35=PCB36=PCB37=PCB38=PCB39=PCB40=PCB41=PCB42=PCB43=PCB44=PCB45=PCB46=PCB47=PCB48=PCB49=PCB50=PCB51=PCB52=PCB53=PCB54=PCB55=PCB56=PCB57=PCB58=PCB59=PCB60=PCB61=PCB62=PCB63=PCB64=PCB65=PCB66=PCB67=PCB68=PCB69=PCB70=PCB71=PCB72=PCB73=PCB74=PCB75=PCB76=PCB77=PCB78=PCB79=PCB80=PCB81=PCB82=PCB83=PCB84=PCB85=PCB86=PCB87=PCB88=PCB89=PCB90=PCB91=PCB92=PCB93=PCB94=PCB95=PCB96=PCB97=PCB98=PCB99=PCB100"
730 DISP "DISEÑO DE LA LÍNEA DE TRANSFERENCIA DE DATOS" : "PCB1=PCB2=PCB3=PCB4=PCB5=PCB6=PCB7=PCB8=PCB9=PCB10=PCB11=PCB12=PCB13=PCB14=PCB15=PCB16=PCB17=PCB18=PCB19=PCB20=PCB21=PCB22=PCB23=PCB24=PCB25=PCB26=PCB27=PCB28=PCB29=PCB30=PCB31=PCB32=PCB33=PCB34=PCB35=PCB36=PCB37=PCB38=PCB39=PCB40=PCB41=PCB42=PCB43=PCB44=PCB45=PCB46=PCB47=PCB48=PCB49=PCB50=PCB51=PCB52=PCB53=PCB54=PCB55=PCB56=PCB57=PCB58=PCB59=PCB60=PCB61=PCB62=PCB63=PCB64=PCB65=PCB66=PCB67=PCB68=PCB69=PCB70=PCB71=PCB72=PCB73=PCB74=PCB75=PCB76=PCB77=PCB78=PCB79=PCB80=PCB81=PCB82=PCB83=PCB84=PCB85=PCB86=PCB87=PCB88=PCB89=PCB90=PCB91=PCB92=PCB93=PCB94=PCB95=PCB96=PCB97=PCB98=PCB99=PCB100"
740 DISP "DISEÑO DE LA LÍNEA DE TRANSFERENCIA DE DATOS" : "PCB1=PCB2=PCB3=PCB4=PCB5=PCB6=PCB7=PCB8=PCB9=PCB10=PCB11=PCB12=PCB13=PCB14=PCB15=PCB16=PCB17=PCB18=PCB19=PCB20=PCB21=PCB22=PCB23=PCB24=PCB25=PCB26=PCB27=PCB28=PCB29=PCB30=PCB31=PCB32=PCB33=PCB34=PCB35=PCB36=PCB37=PCB38=PCB39=PCB40=PCB41=PCB42=PCB43=PCB44=PCB45=PCB46=PCB47=PCB48=PCB49=PCB50=PCB51=PCB52=PCB53=PCB54=PCB55=PCB56=PCB57=PCB58=PCB59=PCB60=PCB61=PCB62=PCB63=PCB64=PCB65=PCB66=PCB67=PCB68=PCB69=PCB70=PCB71=PCB72=PCB73=PCB74=PCB75=PCB76=PCB77=PCB78=PCB79=PCB80=PCB81=PCB82=PCB83=PCB84=PCB85=PCB86=PCB87=PCB88=PCB89=PCB90=PCB91=PCB92=PCB93=PCB94=PCB95=PCB96=PCB97=PCB98=PCB99=PCB100"
750 IF N=1 THEN GOTO 760
760 DISP "DISEÑO DE LA LÍNEA DE TRANSFERENCIA DE DATOS" : "PCB1=PCB2=PCB3=PCB4=PCB5=PCB6=PCB7=PCB8=PCB9=PCB10=PCB11=PCB12=PCB13=PCB14=PCB15=PCB16=PCB17=PCB18=PCB19=PCB20=PCB21=PCB22=PCB23=PCB24=PCB25=PCB26=PCB27=PCB28=PCB29=PCB30=PCB31=PCB32=PCB33=PCB34=PCB35=PCB36=PCB37=PCB38=PCB39=PCB40=PCB41=PCB42=PCB43=PCB44=PCB45=PCB46=PCB47=PCB48=PCB49=PCB50=PCB51=PCB52=PCB53=PCB54=PCB55=PCB56=PCB57=PCB58=PCB59=PCB60=PCB61=PCB62=PCB63=PCB64=PCB65=PCB66=PCB67=PCB68=PCB69=PCB70=PCB71=PCB72=PCB73=PCB74=PCB75=PCB76=PCB77=PCB78=PCB79=PCB80=PCB81=PCB82=PCB83=PCB84=PCB85=PCB86=PCB87=PCB88=PCB89=PCB90=PCB91=PCB92=PCB93=PCB94=PCB95=PCB96=PCB97=PCB98=PCB99=PCB100"
770 DISP "DISEÑO DE LA LÍNEA DE TRANSFERENCIA DE DATOS" : "PCB1=PCB2=PCB3=PCB4=PCB5=PCB6=PCB7=PCB8=PCB9=PCB10=PCB11=PCB12=PCB13=PCB14=PCB15=PCB16=PCB17=PCB18=PCB19=PCB20=PCB21=PCB22=PCB23=PCB24=PCB25=PCB26=PCB27=PCB28=PCB29=PCB30=PCB31=PCB32=PCB33=PCB34=PCB35=PCB36=PCB37=PCB38=PCB39=PCB40=PCB41=PCB42=PCB43=PCB44=PCB45=PCB46=PCB47=PCB48=PCB49=PCB50=PCB51=PCB52=PCB53=PCB54=PCB55=PCB56=PCB57=PCB58=PCB59=PCB60=PCB61=PCB62=PCB63=PCB64=PCB65=PCB66=PCB67=PCB68=PCB69=PCB70=PCB71=PCB72=PCB73=PCB74=PCB75=PCB76=PCB77=PCB78=PCB79=PCB80=PCB81=PCB82=PCB83=PCB84=PCB85=PCB86=PCB87=PCB88=PCB89=PCB90=PCB91=PCB92=PCB93=PCB94=PCB95=PCB96=PCB97=PCB98=PCB99=PCB100"
780 FOR I=1 TO N
790 DISP "DISEÑO DE LA LÍNEA DE TRANSFERENCIA DE DATOS" : "PCB1=PCB2=PCB3=PCB4=PCB5=PCB6=PCB7=PCB8=PCB9=PCB10=PCB11=PCB12=PCB13=PCB14=PCB15=PCB16=PCB17=PCB18=PCB19=PCB20=PCB21=PCB22=PCB23=PCB24=PCB25=PCB26=PCB27=PCB28=PCB29=PCB30=PCB31=PCB32=PCB33=PCB34=PCB35=PCB36=PCB37=PCB38=PCB39=PCB40=PCB41=PCB42=PCB43=PCB44=PCB45=PCB46=PCB47=PCB48=PCB49=PCB50=PCB51=PCB52=PCB53=PCB54=PCB55=PCB56=PCB57=PCB58=PCB59=PCB60=PCB61=PCB62=PCB63=PCB64=PCB65=PCB66=PCB67=PCB68=PCB69=PCB70=PCB71=PCB72=PCB73=PCB74=PCB75=PCB76=PCB77=PCB78=PCB79=PCB80=PCB81=PCB82=PCB83=PCB84=PCB85=PCB86=PCB87=PCB88=PCB89=PCB90=PCB91=PCB92=PCB93=PCB94=PCB95=PCB96=PCB97=PCB98=PCB99=PCB100"
800 NEXT I
810 END
820 END

```

VIII. CONSIDERACIONES FINALES

RESUMEN Y DISCUSION GENERAL

Los corticoides ejercen diversos y complejos efectos sobre el SN, modificando funciones variadas y diferentes, detectables por medio de la bioquímica, la electrofisiología, la histología y en estudios de comportamiento [44,54-76]. Estos podrían estar mediados por receptores, para los cuales se han encontrado poblaciones heterogéneas en el cerebro [77-85], y tener mecanismos de acción que involucren o no a la regulación de la expresión genética [9, 33-39,41,44,45,132,133].

La ME, que representa una gran parte del SNC, pero al no poseer la extrema diferenciación funcional, estructural y bioquímica del cerebro, no ha sido considerada como un modelo para el estudio de la acción de los corticoides en el SN, pese a la facilidad y simplificación que puede brindar tomarla como modelo efector.

En el presente trabajo se han determinado y caracterizado los principales procesos moleculares involucrados en el mecanismo de acción de los corticoides en la ME, habiéndose obtenido los siguientes resultados:

- 1) Se determinaron sitios de unión citosólicos de GC, habiéndose encontrado una alta afinidad para los corticoides naturales y sintéticos, siendo de estos la DEX y la TA

los que mostraron la mayor afinidad, otros esteroides como la ALDO y la progesterona tuvieron afinidades mucho menores, mientras que la afinidad para andrógenos y estrógenos no fue detectable. Estos sitios de unión tuvieron otras propiedades comunes al receptor de GC nativo de los tejidos efectores clásicos como la termolabilidad, la protección y estabilidad brindada por la presencia de molibdato en el medio de incubación [125,129], el efecto protector del 2-mercaptoetanol que mantiene reducidos los grupos sulfhidrilos, la inhibición de bloqueantes de los mismos [80,128] y el coeficiente de sedimentación en gradientes de glicerol que es de 9-10 S [11,12,84].

Los sitios estaban ampliamente distribuidos en toda la ME, predominando ligeramente en los engrosamientos cervical y lumbar, en los que predomina la sustancia gris. La concentración de estos sitios fue más de la mitad de la hallada en el HC, que tiene la máxima concentración en el SN [105]. La ontogenia reveló un incremento de la unión en las dos primeras semanas de vida, similar al desarrollo en otras regiones del SNC [94] y al de marcadores de células gliales [189].

2) Se comprobó la transformación del complejo hormona-receptor, posterior a la unión, a un estado con mayor densidad de cargas positivas en su superficie que permite

su unión al ADN y otros polianiones. Las condiciones óptimas de transformación fueron: incubación a 20 °C durante 30 min en los complejos en ausencia de molibdato, conocido inhibidor de la transformación [23]. En las incubaciones realizadas en ausencia de molibdato se detectaron dos componentes por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, el pico de los complejos transformados era eluido a menor concentración salina que el de los complejos no transformados [143,144] que eran la única especie identificable en presencia de molibdato. Los complejos transformados se estudiaron también por su unión específica a la fracción nuclear "in vitro" y a minicolumnas de ADN-celulosa. La presencia de los diferentes complejos se detectó tanto en citosoles de la ME como en los de HC. Mediante la utilización de un sistema de minicolumnas combinadas se determinaron otras especies moleculares que no se retienen en ADN o DEAE-celulosa pero sí en HAP y que son identificables con los mero-receptores [11,12]. La transformación es un proceso fundamental en el mecanismo de acción de los GC y ocurre tanto "in vivo" como "in vitro" [12].

3) Se analizaron los niveles "in vivo" de GC en la ME. Las concentraciones de hormona endógena fueron compatibles con la ocupación de los receptores, siendo susceptibles al aumento sistémico producido en casos de estrés,

y a la disminución por ADX. Los niveles encontrados fueron inferiores a los del hipotálamo y similares o aún mayores a otras regiones del cerebro. Por RIA se pudo evidenciar retención nuclear de DORT inyectada. Esta captación fue inhibida por pretratamiento con DEX. Al inyectar dosis traza-doras del GC marcado se halló una incorporación en el ho-mogenato que parecía correlacionarse con el número de recep-tores, sin embargo en la ME la incorporación nuclear fue escasa, siendo en el HC varias veces superior. Esta cap-tación "in vivo" fue similar a la encontrada en el nervio óptico donde los receptores se localizan en células gliales [65], mientras que en el HC existen además sitios de unión en las neuronas [39].

4) Los estudios de unión de (^3H)-ALDO en la ME evi-denciaron la heterogeneidad de la población de receptores de corticoides. En los gráficos de Scatchard se observaron curvas coincidentes con la presencia de sitios de alta y de baja afinidad por el ligando. El componente de baja afi-nidad, o receptores de tipo II, se identificó como el recep-tor de GC previamente estudiado, por su afinidad, el número de sitios y por no ser detectable en presencia de un com-petidor GC puro (RU 28362). En presencia de RU 28362 se ob-tuvieron gráficos de Scatchard lineales correspondientes a la presencia de los sitios de alta afinidad o de tipo I.

La presencia de ambos tipos de sitios también quedó evidenciada en estudios de competencia de la unión de (^3H)-ALDO utilizando concentraciones variables de anti-GC y anti-MC frente a las concentraciones del ligando marcado, que permitían su unión a los sitios de tipo I solamente o a ambos en proporción similar. Las condiciones escogidas para determinar selectivamente los receptores de tipo I fueron: incubación a 0 °C durante 20 h con (^3H)-ALDO 5 nM y RU 29362 50 nM. La distribución de estos sitios fue similar a la previamente hallada para los del tipo II, predominando en los engrosamientos cervical y lumbar, siendo menor en la cola de caballo y "filum terminale". En el sistema de minicolumnas combinadas se determinó la transformación de estos receptores y la aparición de especies similares a mero-receptores. Las propiedades de estos sitios son similares a las del receptor de MC de otros tejidos [79,82-85,167-170,177,178]. Estos sitios serían de importancia biológica y podrían ser responsables de efectos sobre el balance de electrolitos, el edema, y la actividad eléctrica de neuronas descritos en el cerebro [105,169,180,182], pero aún poco estudiados en la ME.

5) Se comprobó la inducibilidad de la GPDH y la ODC en la ME, de acuerdo a lo hallado en otras zonas del SN [65,66]. La GPDH aumenta un 20-40 % luego de tratamientos

crónicos o 20 h después de una única dosis. La ODC presenta un efecto bifásico, aumentando 4 veces luego de 6 h de una única dosis y disminuyendo a la mitad luego de 20 h. Los cambios más rápidos de la ODC pueden interpretarse por un efecto transcripcional directo y por el rápido recambio de esta enzima [205], mientras que el de la GPDH puede atribuirse a un efecto indirecto más lento [9]. El efecto sobre estas enzimas estaría mediado por el receptor de tipo II, de GC, ya que la CORT y la DEX son mucho más potentes que la ALDO para producir el efecto. Otros esteroides no producen aumento. La relación con la ocupación de los receptores queda evidenciada también por la disminución de la unión citosólica de (^3H)-DEX por ocupación o depleción de los sitios receptores. Esta disminución ocurre antes de observarse el efecto sobre las enzimas y es observable con las mismas dosis de GC que aumentan las enzimas. Se determinó la actividad de las enzimas en distintas zonas del SN de ratas ADX y tratadas con GC observando que, con cierta variabilidad, el efecto es generalizado en el SN, y de acuerdo a la localización celular de las enzimas [195,212] se deduce que las células gliales de la ME poseen receptores de GC responsables de los cambios en la ODC y la GPDH.

Todos estos resultados llevan a la conclusión que en

la ME de la rata existen receptores de corticoides, distribuidos en por lo menos dos poblaciones, una con mayor afinidad para GC y otra para los MC. Ambos tipos de sitios son transformables a una conformación con mayor afinidad por la ADN-celulosa. Los niveles endógenos de GC son compatibles con la ocupación de los sitios y existe captación nuclear de la hormona, siendo diferente a la del HC. Los receptores de GC estarían involucrados en los aumentos producidos en las actividades de GPDH y ODC y se encuentran, al menos en parte, en células gliales.

Se han descrito en la ME muchas de las características del mecanismo de acción clásico de los corticoides, por lo que podría extrapolarse lo conocido en los tejidos clásicos a la ME. El receptor sería una molécula oligomérica fosforilada con grupos sulfhidrilos funcionales, luego de unir al esteroide en el citoplasma sufriría un proceso de transformación a un estado monomérico con afinidad por el ADN, probablemente con la pérdida de algún grupo fosfato y un factor estabilizante. Luego el complejo hormona-receptor migraría al núcleo para interactuar con la cromatina, produciendo diversos cambios en la expresión genética, que se traducen en un aumento de ARN mensajero para la síntesis de determinadas proteínas [8,9,40], como la GPDH y la ODC.

Los receptores de corticoides estarían localizados

en gran proporción en células gliales por diversos motivos. En primer lugar se los encuentra en todas las regiones estudiadas, incluida la zona de la cola de caballo que no posee cuerpos neuronales. La distribución relativamente homogénea es una característica poco consistente con la extrema diversidad de tipos de neuronas y más acorde con la probable uniformidad de las células gliales como los astrocitos [189]. En segundo lugar, los GC inducen enzimas fundamentalmente gliales. En tercer lugar, el desarrollo ontogenético de los sitios de unión de GC, que aumenta en las dos primeras semanas de vida, es similar al desarrollo de células gliales [189]. En cuarto lugar, la baja incorporación nuclear "in vivo" en relación al número de sitios citosólicos parece ser una característica de la interacción de los corticoides con las células gliales [65]. La localización neuronal también ha sido hallada en la ME por autorradiografía [96,103,104] y es sugerida por la unión citosólica en regiones enriquecidas en sustancia gris (engrosamientos cervical y lumbar) que fue ligeramente superior a la de las demás zonas [II, V]. Los sitios neuronales parecen ser de mayor importancia en el HC [89] que en la ME.

Las observaciones de los mecanismos moleculares de los corticoides realizadas permiten extrapolar muchos de los resultados obtenidos en otras regiones del SN o en tejidos efectores clásicos de estas hormonas a la ME. Sin embargo,

es importante poder confirmar cada una de las posibles conclusiones que se puedan sacar "a priori" de observaciones parciales. Un ejemplo del peligro de generalizar resultados lo brinda la evolución del modelo de acción de las hormonas esteroides. El modelo clásico postula que los receptores se encuentran en el citoplasma y luego de unirse a la hormona son translocados al núcleo, lo cual parece ser cierto para los corticoides, cuyos receptores determinados por inmunofluorescencia, se localizan en el citoplasma en ausencia de hormona y en el núcleo en su presencia [29,30]. En el caso de los estrógenos se encontró que este modelo no se cumple, ya que recientemente se localizó al receptor libre en el núcleo [216-219]. En la ME se encontró, que a diferencia del HC, los receptores de GC parecen prevalecer en las células gliales, y presentan propiedades diferentes en la incorporación nuclear "in vivo". Esta diferencia resalta también la importancia de trabajar con sistemas vivos, en los cuales se pueden determinar los mecanismos moleculares que ocurren fisiológicamente. Si bien los estudios en sistemas más simplificados, como los cultivos celulares, pueden brindar información difícil de obtener con el animal entero, estos estudios deben tener como marco de referencia obligatorio las observaciones realizadas "in vivo". La ME, por su menor complejidad anatómica y funcional que el cerebro, por la abundancia de tejido que proporciona y por su

excelente respuesta a los corticoides, puede ser el modelo a elegir para estudiar los mecanismos fisiológicos de los corticoides en células gliales.

PERSPECTIVAS

Los trabajos presentados en esta tesis no han agotado el tema de la acción de los corticoides en la ME. No solamente han quedado aspectos que merecían ser considerados, sino que también se han abierto nuevos interrogantes que aumentan aún más las posibilidades de estudio del mecanismo de acción de las hormonas adrenales en el tejido nervioso. Los resultados presentados serán el punto de partida, y seguramente servirán de referencia a importantes investigaciones que se realicen en este tema.

Entre los aspectos en los que aún puede profundizarse se encuentran la determinación de marcadores de la actividad biológica en este tejido. Para los GC podrían estudiarse enzimas tales como la tirosina hidroxilasa, glutamina sintetasa, adenilatociclasa y feniletanolamina-N-metil transferasa; neurotransmisores y neuromoduladores como catecolaminas, serotonina, sustancia P y opiáceos; y nucleótidos cíclicos, que en otros sistemas parecen ser regulables por estas hormonas [69,74,89,220-222]. Para los MC, de los que se posee menor información, podría estudiarse la enzima convertidora de angiotensina I en II [223]. Estos marcadores podrían utilizarse en la determinación de la actividad de los corticoides en el SN en distintos estados fisiológicos o patológicos en los que se encuentra al-

terada la respuesta a estas hormonas, tales como el estrés, la vejez y la diabetes [77,152,224]. La regulación de los receptores por otros factores como lesiones de la ME [100-102,225], o tratamientos con drogas como vasopresina y serotonina que podrían estar involucradas en la regulación del receptor de GC del cerebro [226,227], es otro aspecto que puede ayudar a comprender las funciones de los corticoides en el SN.

Otro interrogante que aún no ha sido completamente dilucidado se refiere a la localización exacta de los receptores, tarea de compleja resolución, que puede encararse mediante determinaciones bioquímicas en pequeñas zonas del tejido extraídas por micropunción de cortes congelados, o bien por autorradiografía de cortes incubados con las hormonas marcadas. Estos estudios se están iniciando en nuestro laboratorio.

El hecho de haber encontrado diferencias en la incorporación nuclear "in vivo" ha planteado la posibilidad que en la ME existan mecanismos alternativos en la acción de los GC que deben ser investigados. Los estudios pueden centrarse en determinar la ocupación de los receptores citosólicos "in vivo" para ver si existen mecanismos de captación diferentes o bien determinar la presencia de inhibidores de la transformación o la translocación del receptor. Otra aproximación al tema es la separación de neuronas de la glía

o el uso de cultivos de diferentes tipos celulares para determinar diferentes poblaciones de receptores.

Si bien mucho es lo que resta por conocerse de los mecanismos moleculares en el SN y muchas son las dificultades que existen para hallar respuestas a los interrogantes, hay varias posibilidades abiertas para intentar conocer mejor estos procesos. Las respuestas podrán surgir en la medida en que estas posibilidades se renueven y se enriquezcan. El objetivo de esta tesis se habrá cumplido si además de haber significado un avance en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos de la acción hormonal, también contribuyó al planteo de estos enfoques renovados.

Eduardo Arí

Alfredo Farfán

REFERENCIAS

II-VI. Capítulos de esta tesis.

1. LANTOS C.P.: Endocrinología molecular de la función mineralocorticoidea. En: Endocrinología Molecular, CALANDRA R.S., DE NICOLA A.F. (eds.). El Ateneo (Buenos Aires) pp.220-237 (1985).
2. DE NICOLA A.F.: Efectos moleculares de los glucocorticoides. En: Endocrinología Molecular, CALANDRA R.S., DE NICOLA A.F. (eds.). El Ateneo (Buenos Aires) pp. 199-219 (1985).
3. MUNCK A., GUYRE P.M., HOLBROOK N.J.: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5: 25-44 (1984).
4. COIRINI H.: Naturaleza y regulación del receptor de mineralocorticoides en el sistema nervioso central. Tesis doctoral en Ciencias Químicas (F.C.E.yN.-U.B.A.,1984).
5. WESPHAL U.: Steroid protein interaction. En: Monographs in Endocrinology, GROSS F., LABHART A., MANN T., SAMUELS L.T., ZANDER J. (eds.).Springer-Verlag (Berlín, 1971).
6. TAIT J.F., BURSTEIN. En : The Hormones, PINECUS G., THIMANN K.V., ASTWOOD E.B. (eds.). Academic Press (N. York) pp.441-557 (1964).
7. PASQUALINI J.R., SUMIDA C.: Mineralocorticoid receptors in target tissues. En: Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones, PASQUALINI J.R. (ed.). Marcel Dekker Inc. (N. York)pp 399-511 (1977).
8. ROUSSEAU G.G.: Structure and regulation of the glucocorticoid hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 38: 1-11 (1984).
9. ROUSSEAU G.G.: Control of gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem. J.* 224:1-12 (1984).
10. GIORGI E.P., STEIN W.D.: The transport of steroids into animal cells in culture. *Endocrinology* 108: 688-697 (1981).
11. SHERMAN M.R., MORAN M.C., TUAZON F.B., STEVENS Y.W.: Structure, dissociation and proteolysis of mammalian steroid receptors: multiplicity of glucocorticoid receptor forms and proteolytic enzymes in the rat liver and kidney cytosols. *J. Biol. Chem.* 258: 10366-10377 (1983).

12. HOLBROOK N.J., BODWELL J.E., JEFFRIES M., MUNCK A.: Characterization of nonactivated and activated glucocorticoid-receptor complexes from intact rat thymus cells. *J. Biol. Chem.* 258: 6477-6485 (1983).
13. WRANGE O., CARLSTEDT-DUKE J., GUSTAFSSON J.-A.: Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 254: 9284-9290 (1979).
14. LUSTENBERGER P., FORMSTECHE P., DAUTREVAUX M.: Purification of rat liver glucocorticoid receptor by affinity chromatography: design of a suitable adsorbent. *J. Steroid Biochem.* 14: 697-703 (1981).
15. CARLSTEDT-DUKE J., OKRET S., WRANGE O., GUSTAFSSON J.-A.: Immunochemical analysis of the glucocorticoid receptor: Identification of a third domain separate from the steroid-binding and DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4260-4264 (1982).
16. GRANDICS P., GASSER D.L., LITWACK G.: Monoclonal antibodies to the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 111: 1731-1733 (1982).
17. DI SORBO D.M., LITWACK G.: Changes in the intracellular levels of pyridoxal 5'-phosphate affect the induction of tyrosine aminotransferase by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 1203-1208 (1981).
18. MUNCK A., WIRA C., YOUNG D.A., MOSHER K.M., HALLAHAN C., BELL P.A.: Glucocorticoid-receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids in thymus cells. *J. Steroid Biochem.* 3: 567-578 (1972).
19. NIELSEN C.L., SANDO J.S., VOGEL W.M., PRATT W.B.: Glucocorticoid receptor inactivation under cell-free conditions. *J. Biol. Chem.* 252: 7568-7578 (1977).
20. HOUSLEY P.R., DAHMER M.K., PRATT W.B.: Inactivation of glucocorticoid binding capacity by protein phosphatases in the presence of molybdate and complete reactivation by dithiothreitol. *J. Biol. Chem.* 257: 8615-8618 (1982).
21. HOUSLEY P.R., PRATT W.B.: Direct demonstration of glucocorticoid receptor phosphorylation by intact L-cells. *J. Biol. Chem.* 258: 4630-4635 (1983).
22. BODWELL J.E., HOLBROOK N.J., MUNCK A.: Evidence for distinct sulfhydryl groups associated with the steroid- and DNA-binding domains of rat thymus glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 23: 4237-4242 (1984).

23. HOUSLEY P.R., GRIPPO J.F., DAHMER M.K., PRATT W.B.: Inactivation, activation and stabilization of glucocorticoid receptors. En: Biochemical Actions of Hormones, vol. XI, LITWACK G. (ed.). Academic Press (Orlando) pp. 347-376 (1984).
24. SCHMIDT T.J., LITWACK G.: Activation of the glucocorticoid-receptor complex. *Physiol. Rev.* 62: 1131-1192 (1982).
25. GRIPPO J.F., HOLMGREN A., PRATT W.B.: Proof that the endogenous, heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 260: 93-97 (1985).
26. BODWELL J.E., HOLBROOK N.J., MUNCK A.: Stabilization of thymic glucocorticoid-receptor complexes by the calcium-activated protease inhibitor, calpastatin. *J. Biol. Chem.* 260: 2601-2604 (1985).
27. MUNCK A., FOLEY R.: Activated and non-activated glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cell: kinetics of formation and relation to steroid structure. *J. Steroid Biochem.* 12: 225-230 (1980).
28. DAHMER M.K., HOUSLEY P.R., PRATT W.B.: Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid-receptor inactivation, transformation and translocation. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 67-81 (1984).
29. GOVINDAN M.V.: Immunofluorescence microscopy of the intra-cellular translocation of glucocorticoid receptor complex in rat hepatoma (HTC) cells. *Exp. Cell Res.* 127: 293-297 (1980).
30. ANTAKLY T., EISEN H.J.: Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells. *Endocrinology* 115: 1984-1989 (1984).
31. MUNCK A., HOLBROOK N.J.: Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells. Rapid kinetic behaviour and a cyclic model. *J. Biol. Chem.* 259: 320-331 (1984).
32. SHERMAN M.R.: Allosteric and competitive steroid-receptor interactions. En: Glucocorticoid Hormone Action, BAXTER J.D., ROUSSEAU G.G (eds.). Springer-Verlag (Berlin) pp. 123-133 (1979).
33. PHAHL M., MCGINNIS D., GRONER B., HYNES N.E.: Correlation of glucocorticoid receptor binding sites on MMTV proviral DNA with hormone inducible transcription. *Science* 222: 1341-1343 (1983).
34. PAYVAR F., WRANGE O., CARLSTEDT-DUKE J., OKRET S., GUSTAFSSON J.-A., YAMAMOTO K.R.: Purified glucocorticoid receptors bind selectively "in vitro" to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids "in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 6628-6632 (1981).

35. PAYVAR F., DE FRANCO D., FIRESTONE G.L., EDGAR B., WRANGE O., OKRET S., GUSTAFSSON J.-A., YAMAMOTO K.R.: Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* 35: 381-392 (1983).
36. GRONER B., KENNEDY N., SKROCH P., HYNES N.E., PONTA H.: DNA sequences involved in the regulation of gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochim. Biophys. Acta* 781: 1-6 (1984).
37. CATO A.C.B., GEISSE S., WENZ M., WESTPHAL H.M., BEATO M.: The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription. *EMBO J.* 3: 2771-2778 (1984).
38. RINGOLD G.M.: Steroid hormone regulation of gene expression. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 529-566 (1985).
39. MOORE D.D., MARKS A.R., BUCKLEY D.I., KAPLER G., PAYVAR F., GOODMAN H.M.: The first intron of human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 699-702 (1985).
40. LAN N.C., KARIN M., NGUYEN T., WEISZ A., BIRNBAUM M.J., EBERHARDT N.L., BAXTER J.D.: Mechanisms of glucocorticoid hormone action. *J. Steroid Biochem.* 20: 77-88 (1984).
41. DUVAL D., DURANT S., HOMO-DELARCHE F.: Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 737: 409-442 (1983).
42. EDWARDSON J.A., BENNETT G.W.: Modulation of corticotrophin-releasing factor from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 251: 425-427 (1974).
43. JONES M.T., HILLHOUSE E.W.: Structure-activity relationship and the mode of action of corticosteroid feedback on the secretion of corticotrophin-releasing factor (corticoliberin). *J. Steroid Biochem.* 7: 1189-1202 (1976).
44. HALL E.D.: Glucocorticoid effects on central nervous excitability and synaptic transmission. *Int. Rev. Neurobiol.* 23: 165-195 (1982).
45. TOWLE A.C., SZE P.Y.: Steroid binding to synaptic plasma membrane: Differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J. Steroid Biochem.* 18: 135-143 (1983).
46. CARPENTER M.B.: *Neuroanatomía Humana*. El Ateneo (Buenos Aires, 1978).

47. IVERSEN L.L.: Química del cerebro. En: El Cerebro, Libros de Investigación y Ciencia. Editorial Labor (Barcelona) pp. 85-96 (1980).
48. STEFANO F.J.E.: Neurotransmisores. En: Endocrinología Molecular, CALANDRA R.S., DE NICOLA A.F. (eds.). El Ateneo (Buenos Aires) pp.245-250 (1980).
49. KATZ B.: Cómo se comunican las células. En: La Célula Viva, Selecciones de Scientific American. H. Blume Ediciones (Madrid) pp. 358-367 (1979).
50. STEVENS C.F.: La neurona. En: El cerebro, Libros de Investigación y Ciencia. Editorial Labor (Barcelona) pp. 25-32 (1980).
51. ZEMAN W., MAITLAND INNES J.R.: Craigie's Neuroanatomy of the Rat. Academic Press (N. York, 1963).
52. GUYTON A.C.: Textbook of Medical Physiology. W.B. Saunders (Philadelphia, 1976).
53. BERALDO W.T.: Fisiología, vol. II. Imprensa da UFMG (Belo Horizonte, 1970).
54. DOUPE A.J., PETERSON P.H.: Glucocorticoids and the developing nervous system. En: Current Topics in Neuroendocrinology, GANTEN D., PFAFF D. (eds.). Springer (Berlín) pp. 23-44 (1982).
55. VON ZERSSEN D.: Mood and behavioral changes under corticosteroid therapy. En: Psychotropic Actions of Hormones, ITIL I.M., LAUDAHN G., HERMAN W.M. (eds.). Spectrum (N. York) pp. 195-222 (1976).
56. GILLIN J.C., JACOBS L.S., FRAM D.H., SNYDER F.: Acute effect of a glucocorticoid on normal human sleep. *Nature* 237: 398-399(1972).
57. BOHUS B., DE KLOET E.R., VELDHUIS H.D.: Adrenal steroids and behavioral adaptation: relationship to brain corticoid receptors. En: Current Topics in Neuroendocrinology, GANTEN D., PFAFF D. (eds.). Springer (Berlín) pp.107-143 (1982).
58. LANDFIELD P.W., WAYMIRE J.C., LYNCH G.: Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlation. *Science* 202: 1098-1101 (1982).
59. FORMAN B.H., MULROW P.J.: Effect of corticosteroids on water and electrolyte metabolism. En: Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology, vol VI, GREEP R.O., ASTWOOD E.B. (eds.). Am. Physiol. Soc.(Washington) pp.179-190 (1975).
60. GRAY P.: Effect of prestimulation on avoidance responding in rats, and hormonal dependence of the effect. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 90: 1-17 (1976).

61. DE KLOET E.R.: Adrenal steroids as modulators of nerve cell function. *J. Steroid Biochem.* 20: 175 (1984).
62. PAPPUS H.M., McCANN W.P., MONTREAL M.D.: Effects of steroids on cerebral edema in cats. *Arch. Neurol.* 20: 207-216 (1969).
63. YU Z., WRANGE O., BOETHIUS J., HATAM A., GRANHOLM L., GUSTAFSSON J.-A.: A study of glucocorticoid receptors in intracranial tumors. *Neurosurgery* 9: 665-671 (1981).
64. DE KLOET E.R.: Function of steroid receptor systems in the central nervous system. *Clin. Neuropharmacol.* 7: 272-280 (1984).
65. MEYER J.S., LEVEILLE P.J., DE VELLIS J., GERLACH J.L., McEWEN B.S.: Evidence for glucocorticoid target cells in rat optic nerve. Hormone binding and glycerolphosphate dehydrogenase induction. *J. Neurochem.* 39: 423-434 (1982).
66. COUSIN M.A., LANDO D., MOGULEWSKY M.: Ornithine decarboxylase induction by glucocorticoids in brain and liver of adrenalectomized rats. *J. Neurochem.* 38: 1296-1304 (1982).
67. SZE P., HEDRICK B.J.: Effects of dexamethasone and other glucocorticoid steroids on tyrosine hydroxylase activity in the superior cervical ganglion. *Brain Res.* 265: 81-86 (1983).
68. MEYER J.S., LUINE V.N., KHYLCHEVSKAYA R.I., McEWEN B.S.: Glucocorticoids and hippocampal enzyme activity. *Brain Res.* 166: 172-175 (1979).
69. PATEL A.J., HUNT A., TAHOUDIN C.S.M.: Regulation of "in vivo" glutamine synthetase by glucocorticoids in the developing brain. *Dev. Brain Res.* 10: 83-91 (1983).
70. MARKEY K.A., TOWLE A.C., SZE P.Y.: Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in mouse locus coeruleus during postnatal development. *Endocrinology* 111: 1519-1523 (1982).
71. TANK A.W., WEINER N.: Induction of tyrosine hydroxylase by glucocorticoids in mouse neuroblastoma cells. Enhancement of the induction by cyclic AMP. *Mol. Pharmacol.* 22: 421-430 (1982).
72. MOORE K.E., PHILLIPSON O.T.: Effects of dexamethasone on phenylethanolamine N-methyltransferase and adrenaline in the brains and superior cervical ganglia of adult and neonatal rats. *J. Neurochem.* 25: 289-294 (1975).
73. BRAUGHLER J.M.: Lipid peroxidation-induced inhibition of γ -aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *J. Neurochem.* 44: 1282-1288 (1985).

74. MOBLEY P.L., MANIER D.H., SULSER F.: Norepinephrine-sensitive adenylate cyclase system in rat brain: role of adrenal corticosteroids. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 266: 71-77 (1983).
75. ELKOUBY A., LEDIG M., MANDEL P.: Effect of hydrocortisone and thyroxine on ATPase activities of neuronal and glial cell lines in culture. *Neurochem. Res.* 7: 387-397 (1982).
76. REIHELD C.T., TEYLER T.J.: Effects of corticosterone on the electrophysiology of hippocampal CA1 pyramidal cells "in vitro". *Brain Res. Bull.* 12: 349-353 (1984).
77. SAPOLSKY R.M., McEWEN B.S.: Adrenal steroids and the hippocampus: involvement in stress and aging. En: *The Hippocampus*, vol III, ISAACSON R., PRIBRAM K.H. (eds.). Plenum Press (N. York, 1985, en prensa).
78. GROSSER B.I., STEVENS W., REED D.J.: Properties of corticosterone binding macromolecules from rat brain cytosol. *Brain Res.* 57: 387-395 (1973).
79. ANDERSON N.S., FANESTIL D.D.: Corticoid receptors in rat brain: evidence for an aldosterone receptor. *Endocrinology* 98: 676-684 (1976).
80. FRIDMAN O., FOGLIA V.G., DE NICOLA A.F.: Reduction in (³H)-corticosterone binding to cytoplasmic receptors in the brain of diabetic rats. *J. Steroid Biochem.* 9: 609-614 (1978).
81. DE NICOLA A.F., TORNELLO S., WEISENBERG L., FRIDMAN O., BIRMINGHAM M.K.: Uptake and binding of (³H)-aldosterone by anterior pituitary and brain regions of adrenalectomized rats. *Horm. Metab. Res.* 13: 103-106 (1981).
82. MOGUILEWSKY M., RAYNAUD J.P.: Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat pituitary and brain. *J. Steroid Biochem.* 12: 309-314 (1980).
83. VELDHUIS H.D., VAN KOPPEN C., VAN ITTERSUM M., DE KLOET E.R.: Specificity of the adrenal steroid receptor system in the rat hippocampus. *Endocrinology* 110: 2044-2051 (1982).
84. COIRINI H., MARUSIC E.T., DE NICOLA A.F., RAINBOW T.C., McEWEN B.S.: Identification of mineralocorticoid binding sites in rat brain by competition studies and gradient centrifugation. *Neuroendocrinology* 37: 354-360 (1983).
85. BEAUMONT K., FANESTIL D.D.: Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology* 113: 2043-2051 (1983).

86. SCATCHARD G.: The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672 (1949).
87. BEAUMONT K.: Rat C6 glioma cells contain type I as well as type II corticosteroid receptors. *Brain Res.* 342: 252 (1985).
88. KROZOWSKY Z., FUNDER J.W.: Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 6056-6060 (1983).
89. McEWEN B.S.: Glucocorticoids and hippocampus: receptors in search of a function. En: *Current Topics in Neuroendocrinology, Adrenal Action on Brain*, GANTEN D., PFAFF D. (eds.). Springer-Verlag (Berlin) pp. 1-22 (1982).
90. McEWEN B.S., STEPHENSON B.S., KREY L.C.: Radioimmunoassay of brain tissue and cell nuclear corticosterone. *J. Neurosci. Meth.* 3: 57-65 (1980).
91. McEWEN B.S., WALLACH G.: Corticosterone binding to hippocampus: nuclear and cytosol binding "in vitro". *Brain Res.* 57: 373-386 (1973).
92. TURNER B.B., McEWEN B.S.: Hippocampal cytosol binding capacity of corticosterone: no depletion with nuclear loading. *Brain Res.* 35: 602-607 (1980).
93. MEANEY M.J., SAPOLSKY R.M., McEWEN B.S.: The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. I. Ontogeny and autoregulation. *Develop. Brain Res.* 18: 159-164 (1985).
94. OLPE H.R., McEWEN B.S.: Glucocorticoid binding to receptor-like proteins in rat brain and pituitary: ontogenetic and experimentally induced changes. *Brain Res.* 105: 121-128 (1976).
95. TORNELLO S., ORTI E., DE NICOLA A.F., RAINBOW T.C., McEWEN B.S.: Regulation of glucocorticoid receptors in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 35: 411-417 (1982).
96. STUMPF W.E., SAR M.: Steroid hormone target cells in the extra-hypothalamic brain stem and cervical spinal cord: neuroendocrine significance. *J. Steroid Biochem.* 11: 801-807 (1979).
97. CLARK C.R., MACLUSKY N.J., NAFTOLIN F.: Glucocorticoid receptors in the spinal cord. *Brain Res.* 217: 412-415 (1981).
98. HALL E.D., MCGINLEY P.A.: Effects of a single intravenous glucocorticoid dose on biogenic amine levels in cat lumbar spinal cord. *J. Neurochem.* 39: 1787-1790 (1982).

99. HALL E.D., BRAUGHLER J.M.: Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the "in vitro" peroxidation of cat spinal cord tissue. *Expl. Neurol.* 73: 321-324 (1981).
100. HALL E.D., WOLF D.L., BRAUGHLER J.M.: Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental post-traumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. *J. Neurosurg.* 61: 124-130 (1984).
101. BRAUGHLER J.M., HALL E.D.: Effects of multy-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J. Neurosurg.* 61: 290-295 (1984).
102. FADEN A.I., JACOBS T.P., PATRICK D.H., SMITH M.T.: Megadose corticosteroid therapy following experimental traumatic spinal injury. *J. Neurosurg.* 60: 712 (1984).
103. DUNCAN G.E., STUMPF W.E.: Target neurons for (³H)-corticosterone in the rat spinal cord. *Brain Res.* 307: 321-326 (1984).
104. BIRMINGHAM M.K., SAR M., STUMPF W.E.: Localization of aldosterone and corticosterone in the central nervous system, assesed by quantitative autoradiography. *Neurochem. Res.* 9: 333-350 (1984).
105. McEWEN B.S.: Influences of adrenocortical hormones on pituitary and brain function. En: *Glucocorticoid Hormone Action, Monographs in Endocrinology*, vol. 12, BAXTER J.D., ROUSSEAU G.G. (eds.). Springer-Verlag (Berlin) pp.467-492 (1979).
106. STUMPF W.E., SAR M.: Anatomical distribution of corticosterone-concentrating neurons in rat brain. En: *Anatomical Neuroendocrinology*, STUMPF W.E., GRANT L.D. (eds.). Karger (Basel) pp. 254-261 (1975).
107. BEATTY P.A., BEATTY W.W., BOWMAN R.E., GILCHRIST J.C.: The effects of ACTH, adrenalectomy and dexamethasone on the acquisition of an avoidance response in rats. *Physiol Behav.* 5: 939-944 (1970).
108. FELDMAN S., CONFORTI N.: Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity. *Neuroendocrinology* 30: 52-55 (1980).
109. KENDALL J.W.: Dexamethasone stimulation of running activity in the male rat. *Hormones Behav.* 1: 327-336 (1970).
110. McEWEN B.S.: Adrenal steroid feedback on neuroendocrine tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 297: 568-579 (1977).

111. MICHAL E.K.: Dexamethasone inhibits multi-unit activity in the rat hippocampus. *Brain Res.* 65: 180-183 (1974).
112. LUINE V.N., KYLCHEVSKAYA R.I., McEWEN B.S.: Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Res.* 86: 293-306 (1975).
113. MORRELL J.I., WOLINSKY T.D., KRIEGER M.S., PFAFF D.W.: Autoradiographic identification of estradiol-concentrating cells in the spinal cord of the female rat. *Exp. Brain Res.* 45: 144-150 (1982).
114. HELLER C., COIRINI H., DE NICOLA A.F.: Binding of (³H)-dexamethasone by rat placenta. *Endocrinology* 108: 1697-1702 (1981).
115. ROUSSEAU G.G., BAXTER J.D., TOMKINS G.M.: Glucocorticoid receptor: relations between steroid binding and biologic effects. *J. Mol. Biol.* 67: 99-115 (1972).
116. GINSBURG M., GREENSTEIN B.D., McLUSKY N.J., MORRIS I.D., THOMAS P.J.: An improved method for the study of high affinity steroid binding: oestradiol binding in brain and pituitary. *Steroids* 23: 773-792 (1974).
117. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
118. BURTON K.: A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323 (1956).
119. SAGRIPANTI J.L., SANTA COLOMA T.A., CALVO J.C.: A simple computer program for Scatchard statistical analysis on a low cost desktop calculator. *Acta Physiol. Pharm. Latinoam.* 34: 45-54 (1984).
120. OJASOO T., RAYNAUD J.P.: Unique steroid congeners for receptor studies. *Cancer Res.* 38: 4186-4198 (1978).
121. NIU E.M., NEAL R.M., PIERCE V.K., SHERMAN M.R.: Structural similarity of molybdate stabilized steroid receptors in human breast tumors, uteri and leukocytes. *J. Steroid Biochem.* 15: 1-10 (1981).
122. MARTIN R.G., AMES B.N.: A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236: 1372-1379 (1961).
123. ROUSSEAU G.G.: Interaction of steroids with hepatoma cells: molecular mechanism of glucocorticoid hormone action. *J. Steroid Biochem.* 6: 75-89 (1975).

124. RAYNAUD J.P., BOUTON M.M., MOGUILEWSKY M., OJASOO T., PHILIBERT D., BECK G., LABRIE F., MORNON J.P.: Steroid hormone receptors in pharmacology. *J. Steroid Biochem.* 12: 143-157 (1980).
125. HELLER C., COIRINI H., DE NICOLA A.F.: The placenta as a glucocorticoid target tissue: exchange assay of (³H)-dexamethasone binding and effect of steroids on receptor content. *Horm. Metab. Res.* 15: 41-45 (1983).
126. ROSNER W., POLIMENI S.T.: An exchange assay for the cytoplasmic glucocorticoid receptor in the liver of the rat. *Steroids* 31: 427-438 (1978).
127. LUTTGE W.G., DENSMORE C.L., GRAY H.E.: Kinetic analyses of activation induced changes in the hydrodynamic and surface properties of glucocorticoid receptor complex in mouse brain. *Neurochem. Res.* 9: 273-282 (1984).
128. STITH R.D., DANA R.C.: Characteristics of dexamethasone binding to hippocampal cytosol receptors. *J. Steroid Biochem.* 10: 147-153 (1979).
129. LEACH K.L., DAHMER M.K., HAMMOND N.D., SANDO J.J., PRATT W.B.: Molybdate inhibition of glucocorticoid receptor inactivation and transformation. *J. Biol. Chem.* 254: 11884-11890 (1979).
130. RAYNAUD J.P., OJASOO T., VACHE V.: Stable and specific tracers. In: *Reproductive Processes and Contraception*, McKERNS (ed.). Plenum Publishing corp. (N. York) pp. 163-179 (1981).
131. BROWN J., PEARSON C.M.: *Clinical Use of Adrenal Steroids*. McGraw-Hill Inc. (N. York, 1960).
132. McEWEN B.S., DAVIS P.G., PARSON B., PFAFF D.W.: The brain as a target for steroid hormone action. *Ann. Rev. Neurosci.* 2: 65-112 (1979).
133. TEYLER T.J., VARDARIS R.M., LEWIS D., RAWITCH A.B.: Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science* 209: 1017-1019 (1980).
134. ORTI E., COIRINI H., DE NICOLA A.F.: Properties and distribution of glucocorticoid binding sites in cytosol of the spinal cord. *Neuroendocrinology* 40: 225-231 (1985).
135. BAXTER J.D., ROUSSEAU G.G., BENSON M.C., GARCEA R.L., ITO J., TOMKINS G.M.: Role of DNA and specific cytoplasmic receptors in glucocorticoid action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1892-1896 (1972).

136. MILGROM E., ATGER M., BAULIEU EE.: Acidophilic activation of steroid hormone receptors. *Biochemistry* 12: 5198-5205 (1973).
137. CAKE N.H., GOIDL J.A., PARCHMAN L.G., LITWACK G.: Involvement of a low molecular weight component(s) in the mechanism of action of the glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 45-52 (1976).
138. CAKE N.H., LITWACK G.: The glucocorticoid receptor. En: *Biochemical Action of Hormones*, LITWACK G. (ed.). Academic Press (N. York) p.317 (1975).
139. DI SORBO D.M., PHELPS D.S., LITWACK G.: Chemical probes of amino acid residues affect the active sites of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 106: 922-929 (1980).
140. LITWACK G., CAKE N.H.: DNA-binding site of activated glucocorticoid-receptor. Interaction with pyridoxal-phosphate. *Fed. Proc.* 36: 911a (1977).
141. KALIMI M., COLMAN P., FIEGELSON P.: The "activated hepatic glucocorticoid receptor complex". *J. Biol. Chem.* 250: 1080-1086 (1975).
142. LEFEVRE B, BAILLY A., SALLAS N. , MILGROM E.: Activated steroid-receptor complex. Comparison of assay using DNA-cellulose or homologous nuclei. *Biochim. Biophys. Acta* 585: 266-272 (1979).
143. SAKAHUE Y., THOMPSON E.B.: Characterization of two forms of glucocorticoid hormone-receptor complex separated by DEAE-cellulose column chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 77: 533-541 (1977).
144. HUTCHENS T.W., HAWKINS E.F., MARKLAND F.S.: Identification of transformed glucocorticoid receptor from dexamethasone resistant melanoma. *J. Steroid Biochem.* 16: 705-711 (1982).
145. LOWRY O.H., LOPEZ J.A.: The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* 162: 421-428 (1946).
146. KOVACS W.J., GRIFFIN J.E., WILSON J.D.: Transformation of human androgen receptors to the deoxyribonucleic acid-binding state. *Endocrinology* 113: 1574-1581 (1983).
147. Mc EWEN B.S., ZIGMOND R.E.: Isolation of brain cell nuclei. En: *Research Methods in Neurochemistry*, vol. I, MARKS N., RODNIGHT R. (eds.). Plenum Press(N. York) pp.140-161 (1972).

148. BARTOVA A.: Endogenous levels of 18-OH-DOC and related steroids in the brain. En: Interaction Within the Brain- Pituitary- Adrenocortical System, JONES. M.T., GILLHAM B., DALLMAN M.F., CHATTO-PADHYAY S. (eds.). Academic Press (London) pp.213-220 (1979).
149. CARROLL B.J., HEATH B., JARRET D.B.: Corticosteroids in brain tissue. *Endocrinology* 97: 290-300 (1975).
150. McEWEN B.S., WEISS J.M., SCHWARTZ L.S.: Retention of corticosterone by cell nuclei from brain regions of adrenalectomized rats. *Brain Res.* 17: 471-482 (1970).
151. McEWEN B.S., BIEGON A., DAVIS P.G., KREY L.C., LUINE V.N., MCGINNIS M.Y., PADEN C.M., PARSONS B., RAINBOW T.C.: Steroid hormones: humoral signals which alter brain cell properties and functions. *Rec. Prog. Horm. Res.* 38: 41-92 (1982).
152. TORNELLO S., COIRINI H., DE NICOLA A.F.: Effects of experimental diabetes on the concentration of corticosterone in central nervous system, serum and adrenal glands. *J. Steroid Biochem.* 14: 1279-1284 (1981).
153. UNDERWOOD R.H., WILLIAMS G.H.: The simultaneous measurement of aldosterone, cortisol and corticosterone in human peripheral plasma by displacement analysis. *J. Lab. Clin. Med.* 79: 848-862 (1972).
154. JOHANSSON E.D.B.: Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique. *Acta Endocrinol. Copenh.* 61: 592-606 (1969).
155. RODBARD D., LEWALD J.E.: Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data. En: *Steroid Assay by Protein Binding*, DICZFALUSY E. (ed.). Stockholm pp. 79-103 (1970).
156. MURPHY B.E.P.: Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27: 973-990 (1967).
157. ORTI E., TORNELLO S., DE NICOLA A.F.: Dynamic aspects of glucocorticoid receptors in the spinal cord of the rat. *J. Neurochem* 45: (1985, en prensa).
158. MARTIN P.M., SHERIDAN P.J.: Towards a new model for the mechanism of action of steroids. *J. Steroid Biochem.* 16: 215-229 (1982).
159. LIU S.L.M., WEBB T.E.: Elevated concentration of a dexamethasone-receptor translocation inhibitor in Novikoff hepatoma cells. *Cancer Res.* 37: 1763-1767 (1977).

160. McEWEN B.S., LAMBDIN L.T., RAINBOW T.C., DE NICOLA A.F.: Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* (1985, en prensa).
161. PHILIBERT D., MOGUILEWSKY M.: RU 28362, a useful tool for the characterization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *The Endocr. Soc. 65 th. Ann. Meet. Abstract 1018* (1983).
162. COIRINI H., MAGARIÑOS A.M., DE NICOLA A.F., RAINBOW T.C., McEWEN B.S.: Further studies of brain aldosterone binding sites employing new mineralocorticoid and glucocorticoid receptors markers "in vitro". *Brain Res.* (1986, en prensa).
163. TORELLI V., HARDY M., NEDELEC L., TOURMINE C., DERAEDT R., PHILIBERT D.: 7 α -alkyl steroidal spirolactones as potent aldosterone antagonists. *Comunicación de Roussel UCLAF* (1983).
164. RODBARD D., PETER M.D., MUNSON J., THAKUR A.K.: Quantitative characterization of hormone receptors. *Cancer* 46: 2907-2918 (1980).
165. CRESSIE N.A.C., KEIGHTLEY D.D.: The underlying structure of the direct linear plot with application to the analysis of hormone-receptor interactions. *J. Steroid Biochem.* 11: 1173-1180 (1979).
166. WINER B.J.: *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill Kogakusha (Tokio, 1971).
167. FUNDER J.W., FELDMAN D., EDELMAN I.S.: The roles of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology* 92: 994-1004 (1973).
168. LAN N.C., MATULICH D.T., MORRIS J.A., BAXTER J.D.: Mineralocorticoid receptor-like aldosterone binding protein in cell culture. *Endocrinology* 109: 1963-1970 (1981).
169. KROZOWSKY Z., FUNDER J.W.: Mineralocorticoid receptors in rat anterior pituitary: toward a redefinition of "mineralocorticoid hormone". *Endocrinology* 109: 1221-1224 (1981).
170. KORNEL L., KANAMARLAPUDI N., TRAVERS T., TAFF D.I., PATEL N., CHEN C., BAUM R.M., RAYNOR W.J.: Studies on high affinity binding of mineralo and glucocorticoid in rabbit aorta cytosol. *J. Steroid Biochem.* 16: 245-264 (1982).
171. SAKLY M., PHILIBERT D., LUTZ-BUCHER B., KOCH B.: Paradoxical involvement of glucocorticoid receptors in the aldosterone-induced impairment of ACTH secretion from perifused pituitary glands. *J. Steroid Biochem.* 20: 1101-1104 (1984).

172. KRAULIS I., FOLDES G., TRAIKOV H., DUBROVSKY B., BIRMINGHAM M.K.: Distribution, metabolism and biological activity of deoxycorticosterone in the central nervous system. *Brain Res.* 88: 1-4 (1975).
173. DE KLOET E.R., WALLACH G., McEWEN B.S.: Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 96: 598-609 (1975).
174. REXED B.: A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 100: 297 (1954).
175. LUTTGE W.G., DENSMORE C.L.: Temperature-dependent kinetic correlates of the activation of the glucocorticoid receptor complex. *J. Neurochem.* 42: 242-247 (1984).
176. AGARWAL M.K.: Identification and properties of renal mineralocorticoid receptors in relation to glucocorticoid binders in rat liver and kidney. *Biochem. J.* 154: 567-575 (1976).
177. PALEM-VLIERS M., HACHA R., SAINT-REMY A., FREDERICQ E., GENARD P.: Physico-chemical characterization of cytosol and nuclear mineralocorticoid receptors in rat kidney. *J. Steroid Biochem.* 16: 457-461 (1982).
178. SHERMAN M.R., PICKERING L.A., ROLLWAGEN F.M., MILLER L.K.: Mero-receptors: proteolytic fragments of receptors containing the steroid-binding site. *Federation Proc.* 37: 167-173 (1978).
179. FLUHARTY S.J., EPSTEIN A.N.: Sodium appetite elicited by intracerebro-ventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav. Neurosci.* 97: 746-758 (1978).
180. SELLER M.J., SPECTOR R.G.: Influence of cortisol, aldosterone and 2-methyl-1,2-di-3-pyridylpropan-1-one on cerebral water content. *J. Endocr.* 25: 115-118 (1962).
181. WEISS J.M., GRAG P.: Hormones and avoidance behavior. Different approach point to a role for mineralocorticoids. *Prog. Brain Res.* 39: 471-479 (1973).
182. WOODBURY D.M.: Relation between the adrenal cortex and the central nervous system. *Pharmac. Rev.* 10: 275-357 (1958).
183. COIRINI H., WHITE A., MARUSIC E.T., DE NICOLA A.F.: Characteristics of aldosterone binding in rat and human serum. *Acta Physiol. Latinoam.* 32: 1-10 (1982).
184. TORRES H.N., CARMINATTI H., CARDINI C.E.: *Bioquímica General*. El Ateneo (Buenos Aires, 1983).

185. LEHNINGER A.L.: Bioquímica. Ediciones Omega (Barcelona, 1980).
186. DE VELLIS J., INGLISH D.: Hormonal control of glycerolphosphate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* 15: 1061-1070 (1968).
187. DE VELLIS J.: Mechanisms of enzymatic differentiation in the brain and in cultured cells. En: *Development and Aging in The Nervous System*, ROCKSTEIN M. (ed.). Academic Press (N.York) pp. 171-193 (1973).
188. BREEN G.A.M., DE VELLIS J.: Regulation of glycerolphosphate dehydrogenase by hydrocortisone in rat brain explants. *Exp. Cell Res.* 91: 159-169 (1975).
189. DE VELLIS J., INGLISH D.: Age-dependent changes in the regulation of glycerolphosphate dehydrogenase in the rat brain and in a glial cell line. En: *Neurobiological Aspects of Maturation and Aging*, Progress in Brain Research, vol. 40, FORD D.H. (ed.). Elsevier Sci. Pub. Co. (Amsterdam) pp.321-330 (1973).
190. DE VELLIS J., INGLISH D., COLE R., MOLSON J.: Effects of hormones on the differentiation of cloned lines of neurons and glial cells En: *Influence of Hormones on The Nervous System*, FORD D.H. (ed.). Karger (Basel) pp.25-39 (1971).
191. CLAISE P.J., ROSCOE J.P.: The inducibility of glycerol phosphate dehydrogenase in two rat glial clones. *Brain Res.* 109: 423-425 (1976).
192. MCGINNIS J.F., DE VELLIS J.: Glucocorticoid regulation in rat brain cell cultures: hydrocortisone increases the rate of synthesis of glycerolphosphate dehydrogenase in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 253: 8483-8492 (1978).
193. DAVIDSON R.L., BENDA P.: Regulation of specific functions of glial cells in somatic hybrids. II. Control of inducibility of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67: 1870-1877 (1970).
194. DE VELLIS J., INGLISH D., GALEY F.: Effects of cortisol and epinephrine on glial cells in culture. En: *Cellular Aspects of Growth and Differentiation in Nervous Tissue*, PEASE D. (ed.). Univ. Calif. Press (Berkeley) pp.23-32 (1971).
195. LEVEILLE P.J., MCGINNIS J.F., MAXWELL D.S., DE VELLIS J.: Immunocytochemical localization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in rat oligodendrocytes. *Brain Res.* 196: 287-305 (1980).
196. ALGRANATI I.D., GOLDEMBERG S.H.: Polyamines and their role in protein synthesis. *TIBS* 2: 272-274(1977).

197. RUSSELL D.: Ornithine decarboxylase as a biological and pharmacological tool. *Pharmacology* 20: 117-129 (1973).
198. PANKO W.B., KENNEY F.T.: Hormonal stimulation of hepatic ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43:346-350 (1971).
199. RICHARDS J.F.: Ornithine decarboxylase activity in lymphoid tissue of rats: effects of glucocorticoids. *Life Sci.* 23: 1619-1624 (1978).
200. TORNELLO S., ORTI E., WEISENBERG L., DE NICOLA A.F.: Regulation of adenosine-3',5'-monophosphate levels in rat anterior pituitary by adrenal corticoids. *Metabolism* 33: 224-229 (1984).
201. MCGINNIS J.F., DE VELLIS J.: Purification and characterization of rat brain glycerolphosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 364: 17-27 (1974).
202. RUSSEL D., SNYDER S.H.: Amine synthesis in rapidly growing tissues ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver , chick embryo and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 60: 1420-1427 (1968).
203. HANSEN D.L., BUSH E.T.: Improved solubilization procedures for liquid scintillation counting of biological materials. *Anal. Biochem.* 18: 320 (1967).
204. PEGG A.E., LOCKWOOD D.H., WILLIAMS A.S., MAN H.G.: Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymatic synthesis during androgen induced prostatic growth. *Biochem. J.* 117: 17-31 (1970).
205. TABOR C.W., TABOR H.: Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 749-790 (1984).
206. MCGINNIS J.F., DE VELLIS J.: Cortisol induction of glycerolphosphate dehydrogenase in a rat brain tumor cell line. *Nature* 250: 422-424 (1974).
207. KUMAR S., WEINGARTEN D.P., CALLAHAN J.W., SACHAR K., DE VELLIS J.: Regulation of mRNA's for three enzymes in the glial cell model C6 cell line. *J. Neurochem.* 43: 1455-1463 (1984).
208. RICHMAN R.A., UNDERWOOD L.E., VAN WYK J.J., VOINA S.J.: Synergistic effect of cortisol and growth hormone on hepatic ornithine decarboxylase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 880-884 (1971).
209. BECK W.T., BELLANTONE R.A., CANELLAKIS E.S.: The "in vivo" stimulation of rat liver ornithine decarboxylase activity by dibutiryl cyclic adenosine-3',5'-monophosphate, theophylline and dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48: 1649-1655 (1972).

210. MCGINNIS J.F., DE VELLIS J.: Purification and hormonal regulation of brain glycerolphosphate dehydrogenase "in vivo" and in a rat glial cell line. *Fed. Proc.* 32: 604 (1973).
211. ROUSSEAU G.G., AMAR-COSTESSEC A., VERHAEGEN M., GRANNER D. K.: Glucocorticoid hormones increase the activity of plasma membrane alkaline phosphodiesterase I in rat hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1005-1009 (1980).
212. LEWIS M.E., LAKSHMANAN J., NAGAI AH K., MAC DONNELL P.C., GUROFF G.: Nerve growth factor increases activity of ornithine decarboxylase in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1021-1023 (1978).
213. OVADIA H., VLODAVSKY I., ABRAMSKY O., WEIDENFELD J.: Binding of hormonal steroids to isolated oligodendroglia and astroglia grown "in vitro" on a naturally produced extracellular matrix. *Clin. Neuropharmacol.* 7: 307-311 (1984).
214. TARDY M., ROLLAND B., FAGES C., CALDANI M.: Astroglial cells: glucocorticoid target cells in the brain. *Clin. Neuropharmacol.* 7: 296-302 (1984).
215. WEIR M.D., THOMAS D.G.T.: Effect of dexamethasone on glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein in normal and transformed astrocytes. *Clin. Neuropharmacol.* 7: 303-306 (1984).
216. PATEL A.J., HUNT A.: Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of fore-brain and cerebellar astrocytes. *Develop. Brain Res.* 18: 175-184 (1985).
217. KING W.J., GREENE G.L.: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307: 745-747 (1984).
218. WELSHONS W.V., LIEVERMAN M.E., GORSKY J.: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307: 747-749 (1984).
219. GORSKY J., WELSHONS W.V., SAKAI D.: Remodeling the estrogen receptor model. *Mol. Cell. Endocrinol.* 36: 11-15 (1984).
220. CULVENOR A.J., ZABRENETZKY V., LOVENBERG N.: Effect of dexamethasone on biopterin levels and tyrosine hydroxylase activity in PC-12 cells. *Biochem. Pharmacol.* 33: 2361-2366 (1984).
221. BOHN M.C., BLOOM E., GOLDSTEIN M., BLACK I.B.: Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) in organ culture of superior cervical ganglia. *Develop. Biol.* 105: 130-136 (1984).

222. LIM A.T.W., OEI T.P., FUNDER J.W.: Prolonged foot-shock induced analgesia: glucocorticoids and non-pituitary opioids are involved. *Neuroendocrinology* 37: 48-51 (1983).
223. EPSTEIN A.N.: Mineralocorticoids and cerebral angiotensin may act together to produce sodium appetite, *Peptides* 3: 493 (1982).
224. SAPOLSKY R.M., KREY L.C., McEWEN B.S.: Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology* 114: 287-292 (1984).
225. HALL E.D.: High-dose glucocorticoid treatment improves neurological recovery in head-injured mice. *J. Neurosurg* 62: 882-887 (1985).
226. KRIEGER D.T.: Serotonin regulation of ACTH secretion. En: *ACTH and Related Peptides: Structure, Regulation and Action*, KRIEGER D.T., GANNONG W.F. (eds.). The New York Academy of Sciences (N. York) pp.527-535 (1977).
227. VELDHUIS H.D., DE KLOET E.R.: Vasopressin-related peptides increase the hippocampal corticosterone receptor capacity of diabetes insipidus (Brattleboro) rats. *Endocrinology* 110:153 (1982).

Comunicaciones de los resultados presentados en esta tesis;

a) Publicaciones:

- ORTI E., COIRINI H., DE NICOLA A.F.: Properties and distribution of glucocorticoid binding sites in cytosol of the spinal cord. *Neuroendocrinology* 40: 225-231 (1985).
- ORTI E., TORNELLO S., DE NICOLA A.F.: Dynamic aspects of glucocorticoid receptors in the spinal cord of the rat. *J. Neurochem.* 45 (1985, en prensa).
- ORTI E., MAGARIÑOS A.M., DE NICOLA A.F.: Evidence of high affinity, stereoselective binding sites for (3H)-aldosterone in the spinal cord. *Neuroendocrinology* (1986, en prensa).
- ORTI E., MOSES D., DE NICOLA A.F.: Glucocorticoid regulation of glycerolphosphate dehydrogenase and ornithine decarboxylase activities in the spinal cord of the rat. (1985, en redacción).

b) Reuniones científicas:

- ORTI E., COIRINI H., DE NICOLA A.F.: Caracterización de los sitios de unión para dexametasona en la médula espinal. Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata 21-24 de noviembre de 1983.
- ORTI E., TORNELLO S., DE NICOLA A.F.: Dinámica del receptor de glucocorticoides en la médula espinal. Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata 14-18 de noviembre de 1984.
- DE NICOLA A.F., COIRINI H., MAGARIÑOS A.M., ORTI E., TORNELLO S.: Distribución regional y propiedades de los receptores de corticoides en el sistema nervioso. Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Sociedad de Biología de Chile, 11-15 de noviembre de 1984, Punta de Tralca, Chile.
- ORTI E., COIRINI H., TORNELLO S., DE NICOLA A.F.: Caracterización del receptor para glucocorticoides en la médula espinal. Asociaciones Argentino-Hispánica e Hispano-Argentina de Medicina y Ciencias Afines, 1-4 de febrero de 1985, Madrid, España.
- ORTI E., MAGARIÑOS A.M., DE NICOLA A.F.: Evidencias de sitios de alta afinidad y estereoselectividad para aldosterona en la médula espinal. Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata 24-28 de noviembre de 1985.
- ORTI E., MOSES D., DE NICOLA A.F.: Regulación de glicerolfosfato deshidrogenasa y ornitina descarboxilasa por glucocorticoides en la médula espinal. Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata 24-28 de noviembre de 1985.

